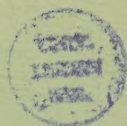


DER PHYTOCHROM-CHROMOPHOR:  
CHEMIE DER PHOTOKONVERSION  
VON PHYTOCHROM

FRIEDRICH THÜMLER

*Dass München*  
*1904*







DER  
PHYTOCHROM-CHROMOPHOR:  
CHEMIE DER PHOTOKONVERSION  
VON PHYTOCHROM

DISSERTATION  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der  
Fakultät für Biologie  
der  
Ludwigs-Maximilians-Universität  
München

vorgelegt  
von  
Friedrich Thümmeler  
aus  
Puchheim

---

Januar 1984

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Scheer

Tag der mündlichen Prüfung: 20. 2. 1984

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. W. Rüdiger am Botanischen Institut der Universität München angefertigt.

Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger danke ich herzlich für die Themastellung sowie für die Unterstützung der Arbeit durch stetes Interesse, hilfreiche Ratschläge und Diskussionen.

Bei Herrn Prof. Dr. H. Scheer und Herrn Prof. Dr. S. Schneider bedanke ich mich herzlich für die hilfreichen Gespräche und wertvollen Anregungen. Ebenso danke ich Herrn Dr. habil. H.-P. Köst für seine Hilfsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. E. Cmiel für sein Interesse und die große Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der NMR-Messungen.

Herrn C. Harzer danke ich für seine tatkräftige Mitarbeit bei der Präparation von Phytochrom.

Der DFG danke ich für die gewährte finanzielle Unterstützung.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

1. Kufer, W., Cmiel, E., Thümmeler, F., Rüdiger, W.,  
Schneider, S., und Scheer, H.:  
Studies on Plant Bile Pigments II. Regioselective Photo-  
chemical and Acid Catalysed Z,E Isomerization of Dihydro-  
bilindione as Phytochrome Model.  
Photochem. Photobiol. 36, 603-607 (1982)
2. Thümmeler, F. und Rüdiger, W.:  
Models for the Photoreversibility of Phytochrome. Z,E  
Isomerization of Chromopeptides from Phycocyanin and  
Phytochrome.  
Tetrahedron 39, 1943 (1983)
3. Thümmeler, F., Rüdiger, W., Cmiel, E. und Schneider, S.:  
Chromopeptides from Phytochrome and Phycocyanin. NMR Studies  
of the  $P_{fr}$  and  $P_r$  Chromophore of Phytochrome and E,Z  
Isomeric Chromophores of Phycocyanin.  
Z. Naturforsch. 38c, 359 (1983)
4. Thümmeler, F. and Rüdiger, W.:  
Circular Dichroism of Phytochromobilin and Related  
Compounds.  
Israel J. Chem, in Druck
5. Rüdiger, W., Thümmeler, F., Cmiel, E. und Schneider, S.:  
Chromophore Structure of the Physiologically Active Form  
( $P_{fr}$ ) of Phytochrome.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80, 6244 (1983)
6. Thümmeler, F. und Rüdiger, W.:  
Chromophore structure in phytochrome intermediates and  
bleached forms of phytochrome.  
Physiol. Plant., in Druck
7. Rüdiger, W. und Thümmeler, F.:  
Low temperature spectroscopy of phytochrome:  
 $P_r$ ,  $P_{fr}$  and intermediates.  
Physiol. Plant., in Druck

## INHALTSVERZEICHNIS

## SEITE

## Abkürzungen

|        |                                                                                            |    |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I.     | Einleitung.....                                                                            | 1  |
| 1.     | Eigenschaften und physiologische Bedeutung<br>des Phytochromsystems.....                   | 1  |
| 2.     | Molekulare Eigenschaften des Phytochroms.....                                              | 5  |
| 2.1.   | Das Protein.....                                                                           | 5  |
| 2.2.   | Der Chromophor.....                                                                        | 7  |
| 2.3.   | Protein-Chromophor-Wechselwirkungen.....                                                   | 11 |
| 3.     | Ziel dieser Arbeit.....                                                                    | 12 |
| II.    | Resultate und Diskussion.....                                                              | 15 |
| 1.     | Spektrale Eigenschaften des Phytochroms in<br>photoreversibler und denaturierter Form..... | 15 |
| 1.1.   | UV-Vis und photochemische Eigenschaften<br>des photoreversiblen Phytochroms.....           | 15 |
| 1.2.   | UV-Vis-Daten des sauer denaturierten<br>Phytochroms.....                                   | 18 |
| 2.     | Peptische Chromopeptide von Phytochrom in<br>der $P_{fr}$ -Form.....                       | 22 |
| 2.1.   | Präparation des $P_{fr}'$ -Chromopeptides.....                                             | 23 |
| 2.2.   | UV-Vis-Daten und wichtige Eigenschaften des<br>$P_{fr}'$ -Chromopeptides.....              | 26 |
| 3.     | ZZE-konfigurierte Gallenfarbstoffe als Mo-<br>dell für den $P_{fr}'$ -Chromophor.....      | 31 |
| 3.1.   | Herstellung ZZE-konfigurierter Gallenfarb-<br>stoff-Chromophore.....                       | 33 |
| 3.1.1. | Präparation ZZE-konfigurierter Modell-<br>chromophore.....                                 | 34 |
| 3.1.2. | Präparation ZZE-konfigurierter Phycocyanin-<br>chromopeptide.....                          | 35 |

|        |                                                                                                                                 |    |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.3. | Darstellung eines E-konfigurierten Chromopeptides aus dem $P_{fr}'$ -Chromopeptid.....                                          | 38 |
| 3.2.   | Eigenschaften der E-konfigurierten Gallenfarbstoffchromophore im Vergleich zu den Eigenschaften des $P_{fr}'$ -Chromophors..... | 38 |
| 4.     | CD- bzw. LICD-Messungen an den Chromopeptiden und E-Z-Isomeren Modellchromophoren und Phycocyanin Chromopeptide.....            | 44 |
| 4.1.   | CD- bzw. LICD-Spektren der Phytochrom-Chromopeptide, E- und Z-konfigurierter Modellchromophore und Phycocyanin-Chromopeptide... | 46 |
| 4.2.   | pH-Abhängigkeit der CD- bzw. der LICD-Spektren der Gallenpigmente und Konformationsvielfalt der Gallenpigmente.....             | 55 |
| 5.     | Strukturaufklärung des Chromophores des $P_{fr}'$ -Chromopeptides mit Hilfe von $^1H$ -NMR-Spektroskopie.....                   | 57 |
| 5.1.   | Wahl des geeigneten Lösungsmittels für die $^1H$ -NMR-Messungen an den Chromopeptiden von Phytochrom und Phycocyanin.....       | 59 |
| 5.2.   | $^1H$ -NMR-Messungen an peptischen Chromopeptiden von Phycocyanin und Phytochrom.....                                           | 62 |
| 5.2.1. | Die Chromophorresonanzen der E- und Z-konfigurierten Chromopeptide.....                                                         | 63 |
| 5.2.2. | Die Chromophorresonanzen des $P_{r}'$ - und $P_{fr}'$ -Chromopeptides.....                                                      | 72 |
| 5.2.3. | Die Aminosäureresonanzen der Phytochrom- und Phycocyanin-Chromopeptide.....                                                     | 76 |
| 6.     | Schlußfolgerungen aus den Spektralmessungen.....                                                                                | 80 |
| 7.     | Die Chromophorstruktur in Phytochrom-Intermediaten und gebleichten Formen des Phytochroms.....                                  | 83 |

|        |                                                                                                                           |     |
|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 7.1.   | Intermediate bei der Photokonversion des<br>Phytochroms.....                                                              | 84  |
| 7.2.   | Charakterisierung der Phytochromintermediate<br>mit Hilfe der Tieftemperatur-Spektroskopie..                              | 87  |
| 7.2.1. | Temperaturabhängige Änderungen im Absorp-<br>tionsspektrum von $P_r$ und $P_{fr}$ .....                                   | 87  |
| 7.2.2. | Intermediate auf dem Weg von $P_r$ nach $P_{fr}$ ....                                                                     | 92  |
| 7.2.3. | Intermediate auf dem Weg von $P_{fr}$ nach $P_r$ ....                                                                     | 102 |
| 7.2.4. | Zusammenfassung der Ergebnisse aus den<br>Tieftemperaturmessungen.....                                                    | 105 |
| 7.3.   | Chemisch gebleichte Phytochromchromophore...                                                                              | 108 |
| 7.3.1. | Reversibles Ausbleichen der Phytochrom-<br>chromophore.....                                                               | 108 |
| 7.3.2. | Irreversibles Ausbleichen der Phytochrom-<br>chromophore.....                                                             | 110 |
| 7.4.   | Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen der<br>Tieftemperaturmessungen und den Versuchen<br>mit gebleichtem Phytochrom..... | 118 |
| 8.     | Abschließende Diskussion.....                                                                                             | 122 |
| III.   | Zusammenfassung.....                                                                                                      | 129 |
| IV.    | Material und Methoden.....                                                                                                | 132 |
| 1.     | Geräte.....                                                                                                               | 132 |
| 2.     | Chemikalien.....                                                                                                          | 136 |
| 3.     | Isolierung von Phytochrom.....                                                                                            | 137 |
| 3.1.   | Sicherheitsvorkehrungen.....                                                                                              | 137 |
| 3.2.   | Pflanzenmaterial und Aufzucht.....                                                                                        | 137 |
| 3.3.   | Spektralphotometrische Bestimmung der Phyto-<br>chromkonzentration und Reinheit.....                                      | 138 |
| 3.4.   | Konventionelle Reinigung von Phytochrom<br>(60 KD).....                                                                   | 139 |

|      |                                                                                                                                           |     |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.5. | Affinitätschromatographische Reinigung von<br>Phytochrom (120 KD).....                                                                    | 142 |
| 4.   | Bereitung des $P_{fr}$ -Chromopeptides.....                                                                                               | 145 |
| 5.   | Isolierung von C-Phycocyanin und PC-Chromo-<br>peptiden aus <u>Spirulina maxima</u> .....                                                 | 145 |
| 6.   | Herstellung von E-konfiguriertem OEBV, DHOEBV<br>und von E-konfigurierten Chromopeptiden aus<br>Phytochrom ( $P_r$ ) und Phycocyanin..... | 146 |
| 7.   | Denaturierung von Phytochrom.....                                                                                                         | 147 |
| 8.   | Berechnung der Absorptionsspektra von rei-<br>nem $P_{fr}$ und Phytochromintermediaten.....                                               | 149 |
| 9.   | Aminosäureanalyse.....                                                                                                                    | 150 |
| V.   | Literaturverzeichnis.....                                                                                                                 | 151 |

# Abkürzungen:

|                   |                                                      |
|-------------------|------------------------------------------------------|
| HR                | Hellrot                                              |
| DR                | Dunkelrot                                            |
| P <sub>r</sub>    | Hellrot absorbierende Form von Phytochrom            |
| P <sub>fr</sub>   | Dunkelrot absorbierende Form von Phytochrom          |
| P <sub>r</sub> '  | Denaturierungsprodukt von P <sub>r</sub>             |
| P <sub>fr</sub> ' | Denaturierungsprodukt von P <sub>fr</sub>            |
| PC                | Phycocyanin                                          |
| OEBV              | Okta-Ethyl-Biliverdin                                |
| DHOEBV            | A-Dihydro-Okto-Ethyl-Biliverdin                      |
| IEP               | Isoelektrischer Punkt                                |
| KPP               | Kaliumphosphat-Puffer                                |
| Tris              | Tris(hydroxymethyl)aminomethan                       |
| DMSO              | Dimethylsulfoxid                                     |
| FMN               | Flavinmononucleotid                                  |
| ANS               | 8-Anilinonaphtalen-1-sulfonsäure, Ammoniumsalz       |
| SDS               | Natriumdodecylsulfat                                 |
| EDTA              | Ethylendiaminotetraessigsäure, Na <sub>4</sub> -Salz |
| CM                | Carboxymethyl-                                       |
| DEAE              | Diethylaminoethyl-                                   |
| TCA               | Trichloressigsäure                                   |
| TFA               | Trifluoressigsäure                                   |



## I. Einleitung

### 1. Eigenschaften und physiologische Bedeutung des Phytochromsystems

Licht ist für die Pflanzen nicht nur als Energiequelle für die Photosynthese von Bedeutung, sondern auch als Träger einer Vielzahl von Informationen über die Lebensbedingungen der Pflanzen (z.B. Tageszeit, Tageslänge, Bedeckung des Samens mit Erde, Beschattung der Blätter). So besitzen sie neben dem Chlorophyll, das zur optimalen Energieversorgung in großen Mengen gebildet wird (Massenpigment), Sensor- oder Sinnespigmente, die in sehr geringen Konzentrationen (Phytochrom in grünen Pflanzen rund  $10^{-6}$  bis  $10^{-8}$  molar; Hartmann und Haupt, 1978) in den Pflanzenzellen als Detektor für lichtinhärente Informationen dienen.

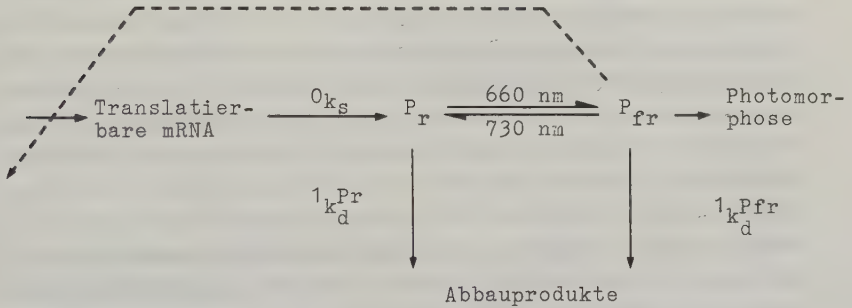
Zur optimalen Anpassung der Organismen an die gegebenen Lichtverhältnisse haben sich verschiedene Sinnespigmente herausgebildet. Bei niederen Pflanzen (z.B. Algen, Farnen und vor allem in Pilzen dominiert ein Blaulichtrezeptor, der aber auch in höheren, samenbildenden Pflanzen gefunden wird (allerdings scheint er einigen höheren Pflanzen ganz zu fehlen, wie z.B. den Keimlingen von Sinapis alba; Mohr und Schopfer, 1978). Es ist unklar, ob dieser Photorezeptor in allen Organismen identisch oder verwandt ist, oder ob er eine ganze Gruppe unterschiedlicher Photorezeptoren darstellt. Wegen seiner schweren Nachweisbarkeit wird er auch als Cryptochrom bezeichnet (Gressel, 1979). In Zellsuspensionskulturen wurde auch ein Photorezeptor gefunden, der maximal im nahen UV absorbiert und dessen Anregung für die Induktion bestimmter biochemischer Stoffwechselwege obligatorisch ist (Mohr und Schopfer, 1978). Die Wirkung des UV-Rezeptors, wie auch einige Blaulichteffekte, stehen ihrerseits unter der Kontrolle des Phytochroms.

Phytochrom spielt bei der Entwicklung und der Regulation der höheren Pflanzen eine entscheidende Rolle, ist aber auch bei

den niederen Pflanzen verbreitet und steuert eine Vielzahl von reversiblen Photomodulationen und irreversiblen Differenzierungsprozessen (Smith, 1975; Mohr und Schopfer, 1978). Charakteristisch für das Phytochrom sind seine photochromen Eigenschaften. Es existiert in einer HR ( $\lambda_{\max} = \text{ca. } 665 \text{ nm}$ ) und in einer DR ( $\lambda_{\max} = \text{ca. } 730 \text{ nm}$ ) absorbierenden Form, die durch Belichtung ineinander überführt werden können. Diese HR-DR Photoreversibilität führte auch zur Entdeckung des Phytochromsystems. Anhand der Samenkeimung bei *Lactuca*, die durch HR-Licht induziert und durch DR-Licht revertiert wird, postulierten Borthwick et al. (1952) einen HR/DR-reversiblen Photorezeptor (zusammengefaßt bei Borthwick, 1972). Er wurde durch Butler et al. (1959) erstmals isoliert und später als Biliprotein identifiziert, das aus dem Apoprotein und einem daran kovalent gebundenen Gallenfarbstoffchromophor besteht (Siegelman et al., 1966; Rüdiger und Correll, 1969). Phytochrom wird im Dunklen in der HR absorbierenden, physiologisch unwirksamen Form ( $P_r$ ) synthetisiert. Durch HR-Belichtung wird es in die physiologisch wirksame, DR absorbierende Form ( $P_{fr}$ ) überführt.  $P_r$  ist im Dunklen stabil, wogegen  $P_{fr}$  in den intakten Pflanzenzellen einer relativ raschen Destruktion unterliegt (Halbwertszeit für  $P_{fr}$  in Dikotylen 30 bis 60 min, in Monokotylen um 90 bis 250 s bei  $25^\circ \text{C}$ ; Hartmann und Haupt, 1978). Dieser Verlust an Phytochrom wird durch eine ständige Neusynthese von  $P_r$  wieder ausgeglichen. Diese führt im Dunklen zu einer rund 100 fachen Anreicherung von Phytochrom gegenüber der Gesamtmenge an Phytochrom, die im Dauerlicht in den Pflanzenzellen nachgewiesen werden kann. Im Dauerlicht stellt sich eine kleine (siehe oben), aber konstante Menge an Phytochrom ein. Somit kann man zwischen einem "stabilen" Lichtphytochrom und einem "labilen" Dunkelphytochrom, das bei Belichtung einer raschen Destruktion unterliegt, unterscheiden. Nach neuesten Ergebnissen scheint es sich tatsächlich um zwei unterschiedliche Phytochromspezies zu handeln, die unterschiedliches immunologisches Verhalten zeigen (Whitelam, 1983). Weiterhin konnte kürzlich gezeigt werden (Colbert et al., 1983; Gottmann und Schäfer, 1983), daß die

rasche Konzentrationsabnahme von Phytochrom im Licht mit einer sehr effektiven Autoregulation der Menge an translatierbarer Phytochrom-mRNA zusammenhängt. Demnach nimmt sie innerhalb 15 min nach einem 5-Sekunden Lichtpuls um rund 50% ab und stellt damit eines der effektivsten Regulationssysteme in einer Pflanzenzelle dar. Diese grundlegenden Eigenschaften des Phytochromsystems sind in Abb. 1 in einem kleinen Schema zusammengefaßt.

Abb. 1: Modell des Phytochromsystems (nach Colbert et al., 1983)



$O_{k_s}$  = Syntheserate 0. Ordnung von  $P_r$

$1_{k_d}^{P_r}$  und  $1_{k_d}^{P_{fr}}$  = Reaktionskonstanten 1. Ordnung für die Destruktion von  $P_r$  und  $P_{fr}$  mit  $1_{k_d}^{P_r} \ll 1_{k_d}^{P_{fr}}$

Die oben genannten Reaktionen benötigen kein Licht und laufen auch im Dunklen ab; die mit nm bezeichneten Pfeile geben die lichtabhängige Photokonversion des Phytochrom wieder. Der unterbrochene Pfeil stellt die hemmende Wirkung von  $P_{fr}$  auf die Bildung translatierbarer Phytochrom-mRNA dar.

Das einmal gebildete  $P_{fr}$  kann je nach Belichtungsverhältnis auf unterschiedliche Weise das Wachstum und Verhalten einer

Pflanze steuern (zusammengefaßt bei Smith, 1975; Mohr und Schopfer, 1978; Pratt, 1979):

Bei kurzzeitigen Belichtungen mit niedrigen Intensitäten treten photoreversible Lichteffekte in den Vordergrund, die auch zur Entdeckung des Phytochromsystems führten (LER = Low Energy Reaction).

Bei andauernder Belichtung mit hoher Intensität treten Hochintensitätsphänomene in den Vordergrund (HIR = High Irradiation Reaction; zusammengefaßt bei Mancinelli und Rabino, 1978). Die HIR unterscheidet sich von der LER dadurch, daß sie nicht von der  $P_{fr}$ -Konzentration, sondern von dem Photonenfluß (Photonen/m<sup>2</sup>·s) abhängt, nicht reversibel ist und ein Wirkungsmaximum im roten Spektralbereich um 700 bis 720 nm besitzt (Hartmann, 1966). Die HIR-Reaktionen stellen damit keine klassischen HR-DR-Phytochromreaktionen dar. Zur Untersuchung der Primärprozesse der phytochromgesteuerten Photomorphosen wurden daher in der Regel LER-Phänomene herangezogen. Über die Reaktionen, die nach der Phototransformation des  $P_r$  zu  $P_{fr}$  stattfinden, ist bisher sehr wenig bekannt. Sie führen, wie schon erwähnt, entweder zu reversiblen Photomodulationen, die durch DR-Bestrahlung wieder rückgängig gemacht werden können (im allgemeinen werden dafür reversible Änderungen von Membraneigenschaften vermutet; Marmé, 1977) oder zu irreversiblen Photodifferenzierungen der Organismen, die auf phytochromgesteuerte Genaktivierungen zurückgeführt wurden (Mohr, 1966; Schopfer, 1977) und nach einigen Minuten nach der Lichtinduktion nicht mehr revertiert werden können. Die Annahme, daß Phytochrom nach der  $P_{fr}$ -Bildung generell über ein und dieselbe Primärreaktion wirkt, konnte bislang nicht bestätigt, aber auch nicht endgültig widerlegt werden (Pratt, 1979). Im Zusammenhang damit sind auch die Ergebnisse aus immunologisch-elektronenmikroskopischen Versuchen zur Lokalisation des Phytochroms innerhalb der Pflanzenzellen von Bedeutung. Demnach liegt Phytochrom im Dunklen diffus im

Protoplasma verteilt, wogegen kurze Zeit nach einem Lichtpuls das Phytochrom partikulär verteilt erscheint (Verbelen et al., 1982 und darin angegebene Literatur).

Trotz unterschiedlicher Funktionsweise des Phytochroms (HIR und LER) und trotz der ungeheuer großen photomorphogenetischen Wirkungsbreite des Phytochroms steht fest, daß im Mittelpunkt all dieser Reaktionen die Photokonversion des Phytochroms von  $P_r$  nach  $P_{fr}$  und umgekehrt steht. Neben den physiologischen Aspekten, die oben knapp zusammengefaßt sind, stellt die Erforschung der photochemischen Prozesse der  $P_r - P_{fr}$ -Umwandlung einen zweiten Hauptkomplex der Phytochromforschung dar. Sie bedient sich in erster Linie chemischer, physikochemischer und biophysikalischer Untersuchungsmethoden. Grundlage für das Verständnis der bei der Photokonversion ablaufenden Reaktionen ist die Kenntnis der molekularen Eigenschaften des Phytochrommoleküls, dessen Stand nachfolgend kurz zusammengefaßt werden soll.

## 2. Molekulare Eigenschaften des Phytochroms

### 2.1. Das Protein

Die wichtigsten Eigenschaften des Phytochromproteins wurden von Pratt (1982) zusammengefaßt: Danach ist das native Phytochrom ein dimeres Protein, das sich aus zwei identischen Monomeren zusammensetzt, die nicht über Disulfidbrücken verknüpft sind. Im in vitro Translationsversuch erhält man ein Translationsprodukt mit einem Molekulargewicht von 124 KD (Gottmann und Schäfer, 1982; Colbert et al., 1983), das als das native Phytochrommonomer betrachtet wird. Dieses ist äußerst empfindlich gegenüber Proteolyse (Vierstra und Quail, 1982a; Kerscher und Nowitzki, 1982), und man kann es unter strikt proteolysehemmenden Bedingungen aus etiolierten Pflanzen isolieren (Vierstra und Quail, 1983a). Bei weniger sorgfäl-

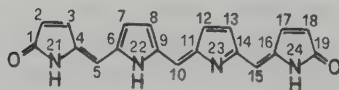
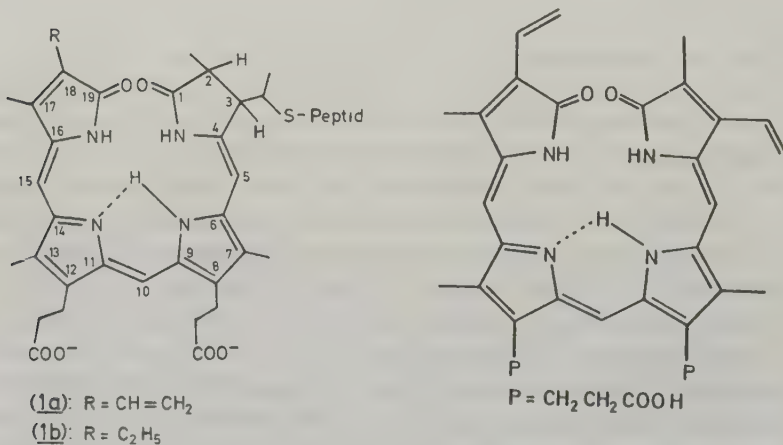
tig eingestellten Versuchsbedingungen erhält man leicht degradiertes Phytochrom, das eine Mischung aus Phytochrombruchstücken von 114 und 118 KD darstellt (es wird im folgenden Text als 120 KD Phytochrom bezeichnet), oder gegenüber weiterer Proteolyse dann weniger empfindliches, relativ einheitliches 60 KD Phytochrom. Degradationsprodukte mit einem Molekulargewicht kleiner rund 55 KD verlieren die Fähigkeit zur photoreversiblen Transformation zwischen  $P_r$  und  $P_{fr}$  (Yamamoto und Furuya, 1983). Nach Brandlmeier et al. (1981a) trägt 60 KD Phytochrom und nach Roux et al. (1982) auch das 120 KD Phytochrommonomer jeweils nur einen einzigen Chromophor. Da sich  $P_r$  und  $P_{fr}$  in ihrer physiologischen Wirksamkeit und im Absorptionsspektrum unterscheiden, muß erwartet werden, daß sich  $P_r$  und  $P_{fr}$  auch in morphologischer Hinsicht unterscheiden. Alle Versuchsergebnisse deuten aber darauf hin, daß beim  $P_r \leftrightarrow P_{fr}$  Übergang keine großen Änderungen im Protein stattfinden. Im Molekulargewicht, elektrophoretisch, immunologisch und im isoelektrischen Punkt lassen sich keine Unterschiede zwischen  $P_r$  und  $P_{fr}$  feststellen. Deshalb war es bisher auch nicht möglich,  $P_r$  und  $P_{fr}$  voneinander abzutrennen. Lediglich zwei Aminosäuren, Histidin und Cystein, scheinen in  $P_{fr}$  stärker exponiert zu sein als in  $P_r$  und geben einen Hinweis auf Änderungen im aktiven Zentrum des Phytochroms (Hunt und Pratt, 1981). Höhere Affinität von  $P_{fr}$  zu Zellpartikeln (zusammengefaßt bei Pratt, 1979) oder zu einigen organischen Molekülen, wie Dextranblau (Smith, 1981), erwiesen sich größtenteils als wenig spezifische, allgemeine Eigenschaften des degradierten Phytochromproteins. Selbst in der, auf Strukturänderungen im Protein relativ empfindlich reagierenden UV-Bande konnten nur geringe Änderungen im Absorptions- wie CD-Spektrum festgestellt werden (Tobin und Briggs, 1973) und die relativ starke Absorption von Gallenfarbstoffen in dieser Bande (siehe Abb. 8) darf dabei nicht vernachlässigt werden. Diese geringen morphologischen

Unterschiede zwischen dem  $P_r$ - und  $P_{fr}$ -Protein deuten auf eine höchst spezifische Wechselwirkung von Phytochrom mit einem speziellen Reaktionspartner hin. Da 60 KD Phytochrom sehr ähnliche spektroskopische und photochemische Eigenschaften wie natives 124 KD Phytochrom besitzt (siehe Kap. II.1.1.) wegen größerer Stabilität aber wesentlich unkritischer zu handhaben ist, wurde es bevorzugt zur Untersuchung der photochemischen Prozesse eingesetzt.

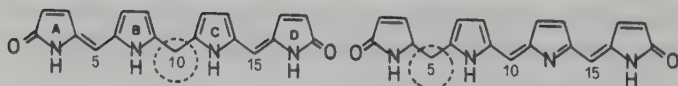
## 2.2. Der Chromophor

Der Chromophor ist der Empfänger der Lichtquanten, die die Photokonversion des Phytochroms auslösen. Um die dabei ablaufenden Reaktionen verstehen zu können, ist es notwendig, dessen Struktur zu kennen. Die Aufklärung der Struktur des  $P_r$ -Chromophors gelang einmal durch vergleichende UV-Vis Spektroskopie (Grombein et al., 1975), Charakterisierung von Abbauprodukten des  $P_r$ -Chromophors nach oxidativer Spaltung mit Chromsäure oder Chromat (Klein et al., 1977), und durch Vergleich von synthetischen Modellchromophoren mit dem vom Protein abgespaltenen Chromophor (Phytochromobilin; Rüdiger et al., 1980; zusammengefaßt bei Rüdiger, 1980). Zum anderen wurden die so gewonnenen Erkenntnisse durch hoch auflösende  $^1\text{H}$ -NMR Spektroskopie an kleinen, hoch gereinigten Chromopeptiden bestätigt (Lagarias et al., 1979; Lagarias und Rapoport, 1980). Damit ist die Struktur des  $P_r$ -Chromophors gesichert: Er ist ein A-Dihydrobiliverdin (1a), das über eine Thioetherbrücke zwischen dem 3'-C und Cystein an die Peptidkette des Proteins gebunden ist. Eine weitere postulierte Bindung des Chromophors über die Propionsäureseitenkette am Ring C (Köst et al., 1975; O'Carra und O'hEocha, 1976) konnte bislang noch nicht eindeutig bestätigt werden (Scheer, 1981). Wegen der großen Ähnlichkeit der Absorptionsspektren von PC,

APC und  $P_r$  schloß man früh (Parker et al., 1950; Siegelman et al., 1966) auf die chemische Verwandtschaft der Chromophore dieser Chromoproteine. In der Tat unterscheidet sich auch der  $P_f$ -Chromophor von dem, in PC und APC identischen Chromophor nur durch einen unterschiedlichen Substituenten am C-18. Bei  $P_r$  ist er eine Vinyl- (1a), in PC eine Ethylgruppe (1b).



(2a) = Verdine



(2b) = Rubin

(2c) = Violin

Der  $P_r$  und PC-Chromophor gehört zur Gruppe der Gallenfarbstoffe, deren Grundgerüst (2) durch vier Pyrrolringe A bis D charakterisiert ist, die linear über 3 Methinbrücken verknüpft sind. Die  $\beta$ -Substituenten sind in den natürlich vorkommenden Gallenfarbstoffen durch ihren universellen Syntheseyklus determiniert (Buttersby, McDonald und O'Carra, 1975). Er verläuft über die  $\delta$ -Aminolaevulinsäure zu Protoporphyrin IX, durch den Einbau von Eisen entsteht Häm, und dessen oxidative Ringöffnung an der  $\alpha$ -Methinbrücke führt zur Bildung von Biliverdin IX $\alpha$  (2) mit den beiden endständigen Sauerstoffatomen. Je nach Aufgabe und Vorkommen können die  $\beta$ -Substituenten modifiziert sein (vergleiche 1a und 1b). Die Eigenschaften der Gallenfarbstoffe (zur Übersicht siehe Scheer, 1981) sind durch die hohe Beweglichkeit der Moleküle (Drehung um die Methineinfachbindung), der Länge der Konjugationssysteme, der Empfindlichkeit der Methindoppelbindungen gegenüber chemischer Modifizierung und die Protonier- bzw. Deprotonierbarkeit der Stickstoffatome in den Pyrrolringen gekennzeichnet. Die Beweglichkeit des Grundkörpers ist die Ursache der äußerst ausgeprägten Fähigkeit der Biline zur Komplexierung von mehrwertigen Metallatomen (Falk und Leodolter, 1978) speziell von  $Zn^{2+}$ , das in seiner Größe genau "hineinpaßt". Weiterhin ist sie hauptsächlich für die überwiegend strahlungslose Desaktivierung der aufgenommenen Lichtenergie bei den freien Gallenfarbstoffen verantwortlich (Braslavsky et al., 1983), die im Gegensatz zu den Porphyrinen so gut wie keine Fluoreszenz zeigen. Wegen des ausgedehnten Konjugationssystems absorbieren die Gallenfarbstoffe sichtbares Licht. Die spektralen Eigenschaften der Biline sind aber höchst variabel. So hat der Protonierungsgrad der Pyrrolstickstoffe einen drastischen Einfluß auf die Absorptionsbanden (Rüdiger, 1980), und die Länge des Konjugationssystems kann sehr leicht durch chemische Modifikation einzelner Methinbrücken variiert werden. Selbst die Nomenklatur<sup>a)</sup> solcher Biliverdin-

---

<sup>a)</sup> Zur Übersicht über die verschiedenen Nomenklaturesysteme siehe McDonagh (1979)

derivate ist durch deren unterschiedliches Absorptionsverhalten bestimmt. Die voll durchkonjugierten Systeme, Bilatriene-abc (2a), werden als "Verdine" bezeichnet, Biline mit unterbrochener Konjugation an der mittleren Methinbrücke, Biladiene-ac (2b), werden wegen ihrer orangeroten Farbe als "Rubine" bezeichnet, und die Gallenfarbstoffe mit entkoppelter endständiger Methinbrücke werden wegen ihrer Violettfärbung je nach Art der Entkopplung (siehe Kap. II.2.2.) als "Purpurine" oder "Violine" bezeichnet (2c). Aufgrund des unterschiedlichen photochemischen Verhaltens der Verdine und Rubine (siehe Kap. II.3.) teilen Falk et al. (1978a) die Gallenpigmente in zwei Klassen ein: Die Bilatriene-abc ordnen sie "bifunktionellen" Systemen zu, die aus identischen Partialstrukturen bestehen (hier die beiden Teilchromophore, die sich aus den Ringen AB und CD zusammensetzen, welche auch als Pyrromethenone bezeichnet werden), die demselben  $\pi$ -Elektronensystem angehören. Die Biladiene-ac klassifizieren sie als "bichromophore" Systeme, die über zwei chromophore Gruppen (die Pyrromethenone) verfügen, die nicht durch Konjugation miteinander in starker elektronischer Wechselwirkung stehen. In Vertebraten kommen Bilirubine als Abbauprodukte des roten Blutfarbstoffes Hämoglobin in der Gallenflüssigkeit vor und haben dadurch der ganzen Verbindungsklasse ihren Namen gegeben. Als Besonderheit im Pflanzenreich besitzen die proteingebundenen Gallenfarbstoffe alle einen hydrierten Ring A (siehe (1)). Köst und Benedikt (1982) konnten zeigen, daß beim "Füttern" der im Dunkeln gewachsenen Rotalge *Cyanidium caldarium* mit  $\delta$ -Aminolaevulinsäure diese Biliverdin IX $\alpha$  ins Medium ausscheidet. Die Autoren schließen daraus, daß Biliverdin IX $\alpha$  eine direkte Vorstufe für die Phycocyaninbiosynthese darstellt. Da eine vollständige in vitro Translation des farblosen Phytochromapoproteins möglich ist (siehe oben), ist es wahrscheinlich, daß der Chromophor erst beim anschließenden post-translatorischen Processing des Proteins über Cystein angekoppelt wird.

### 2.3. Protein-Chromophor-Wechselwirkungen

Die Bindung von Gallenfarbstoffen an Proteine ändert deren spektrale Eigenschaften drastisch. Wegen der komplexen Molekülstruktur der Biliproteine sind diese speziellen Chromophorprotein-Wechselwirkungen sehr schwer zu untersuchen. Nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Protein können bei chemisch identischen Chromophoren zu sehr unterschiedlichem spektroskopischen und reaktiven Verhalten führen (Scheer, 1981). Diese nicht-kovalenten Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Protein sind sehr spezifisch und hängen eng mit der optimalen Anpassung der einzelnen Biliproteine an ihre Photorezeptorfunktion zusammen. So bewirkt der Proteineinfluß eine Erhöhung der Absorption der Gallenfarbstoffe im sichtbaren Spektralbereich und unterdrückt gleichzeitig die, bei freien Gallenfarbstoffen vorherrschende strahlungslose Desaktivierung der eingestrahlten Lichtenergie zugunsten von Fluoreszenz bei Phycobiliproteinen (Antennenpigmente!) oder zu einer gezielten photochemischen Reaktion bei Phytochrom (Sinnespigment!). Ebenso stabilisiert das Protein den gegenüber Oxidation und zweiwertigen Metallionen höchst empfindlichen Dihydro-Gallenfarbstoffchromophor in sehr hohem Maß. Auf Störungen in der Proteinumgebung reagieren die Gallenfarbstoffchromophore sehr empfindlich. So zeigt natives 124 KD Phytochrom so gut wie keine Dunkelreversion von  $P_{fr}$  zu  $P_r$  (Vierstra und Quail, 1983a), wogegen degradiertes Phytochrom im Dunklen innerhalb weniger Stunden zum großen Teil von  $P_{fr}$  zu  $P_r$  revertiert (Smith und Kendrick, 1976; Pratt, 1978). Damit scheint dieser viel diskutierte Effekt eher ein präparatives Artefakt zu sein und besitzt wohl keine physiologische Bedeutung. Die Kenntnis über die Reaktionen, die bei der Photokonversion zwischen  $P_r$  und  $P_{fr}$  stattfinden, ist bisher nur lückenhaft. Es spricht vieles dafür, daß analog zu den Reaktionen des Rhodopsins (Ottoleghi, 1980) nur der Primärschritt photochemisch ist und

die weiteren Schritte, die über mehr oder weniger spektral definierte Zwischenprodukte führen, Dunkelreaktionen sind (Kendrick und Spruit, 1977). Da einige dieser Intermediate unter bestimmten Bedingungen eine sehr lange Lebensdauer haben (im Dauerlicht liegt Phytochrom bis zu 50% als Intermediate vor) kann eine physiologische Aktivität dieser Intermediate nicht ausgeschlossen werden (Pratt, 1979).

### 3. Ziel dieser Arbeit

Der erste Schritt in der Signalübertragungskette der von Phytochrom gesteuerten Photomorphosen ist die Photokonversion des Phytochroms von der  $P_r$ - in die  $P_{fr}$ -Form. Die Kenntnisse über die dabei ablaufenden Reaktionen sind aber, wie bereits erwähnt, sehr gering.

Trotz spektraler Unterschiede zwischen  $P_r$  und  $P_{fr}$  konnten nach chemischer Analyse bisher keine Unterschiede zwischen dem  $P_r$ - und dem  $P_{fr}$ -Chromophor gefunden werden. Dieser Befund beschränkt sich aber nur auf die  $\beta$ -Seitenketten und die kovalente Protein-Chromophorbindung, die demnach keine Änderungen während der Photokonversion erfahren, da er durch Charakterisierung der Bruchstücke gewonnen wurde, die bei einer oxidativen Spaltung der Phytochromchromophore entstehen (Klein et al., 1977). Bei dieser Analysenmethode gehen Modifikationen an den reaktiven Methinbrücken verloren, aber Ergebnisse von Grombein et al. (1975) zeigten, daß gerade dort die Unterschiede zwischen dem  $P_r$ - und  $P_{fr}$ -Chromophor lokalisiert sein könnten. Sie stellten fest, daß bei saurer Denaturierung von  $P_{fr}$  eine Chromophorspezies  $P_{fr}'$  entsteht, die gegenüber dem Denaturierungsprodukt von  $P_r$  ( $= P_r'$ ) kürzerwelliger absorbiert (siehe Abb. 3).  $P_{fr}'$  ist nur metastabil und revertiert im Dunklen bei Raumtemperatur innerhalb weniger Stunden, bei einem Lichtblitz sofort irreversibel zu  $P_r'$  zurück, das selbst gegenüber Belichtung stabil ist.

Diese Versuche beweisen, daß neben Konformationsunterschieden und unterschiedlicher Protonierung, die als Ursache für die unterschiedlichen Absorptionseigenschaften von  $P_r$  und  $P_{fr}$  diskutiert wurden (Crespi et al., 1968; Fuhrhop et al., 1974; zusammengefaßt und diskutiert bei Lagarias und Rapoport, 1980), die aber unter den gegebenen denaturierenden Bedingungen aufgehoben werden, andere Unterschiede existieren müssen, die gegenüber der Denaturierung des Proteins stabil sind. Versuche an Modellchromophoren konnten zeigen, daß Gallenfarbstoffe mit einer aus dem Konjugationssystem entkoppelten, endständigen Methinbrücke ähnliche Spektraleigenschaften wie  $P_{fr}'$  besitzen, wogegen der  $P_r'$ -Chromophor den voll durchkonjugierten Systemen sehr ähnlich ist (Grombein et al., 1975). Zur Verkürzung des Konjugationssystems an einer endständigen Methinbrücke kann es im wesentlichen durch zwei unterschiedliche Reaktionen kommen:

- a) Durch aerobe Photooxidation oder anaerobe Photoaddition an der, dem A-Dihydroring benachbarten Methinbrücke (Krauss, 1980), die gegenüber elektrophilem Angriff besonders empfindlich ist (Scheer et al., 1982). Demnach würde dann  $P_{fr}'$  einem Purpurin bzw. Violinderivat des  $P_r'$ -Chromophors entsprechen.
- b) Durch E-Z-Isomerisierung (Falk und Grubmyer, 1977). Dann würde  $P_r'$  und  $P_{fr}'$  in Analogie zum Rhodopsin (Ottolenghi, 1980) E-Z Isomere darstellen.

Die Beobachtungen von Grombein et al. (1975), daß  $P_{fr}'$  gegenüber  $P_r$  offensichtlich ein verkürztes Konjugationssystem besitzt, war deshalb besonders überraschend, da  $P_{fr}$  gegenüber  $P_r$  um rund 70 nm längerwellig absorbiert. Damit zerlegt sich das Verständnis der  $P_{fr}$ -Absorption in zwei Fragekomplexe:

- a) Worin besteht der Unterschied zwischen dem  $P_r$ - und  $P_{fr}$ -Chromophor, damit nach Denaturierung des Proteins Chromophorspezies vorliegen, die verschieden lange Konjugationssysteme besitzen.

- b) Wie bewirkt das Protein, daß die Chromophorspezies mit verkürztem Konjugationssystem im nativen Protein längerwellig absorbiert als die, auch im denaturiertem Zustand voll durchkonjugierte Chromophorspezies.

In der dieser Arbeit vorangegangenen Diplomarbeit konnte gezeigt werden, daß unter schonenden Proteolysebedingungen aus  $P_{fr}$  kleine Chromopeptide gewonnen werden können, die den  $P_{fr}'$ -Chromophor mit den oben beschriebenen Eigenschaften tragen. Diese Chromopeptide stellen ein sehr günstiges System dar, die Unterschiede zwischen dem  $P_r'$ - und  $P_{fr}'$ -Chromophor aufzuklären, da in diesem Fall der störende Einfluß des über den Chromophor dominierenden Apoproteins wegfällt. Deshalb sollte als erstes versucht werden, das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid in großen Mengen mit hohem Reinheitsgrad zu isolieren, um es dann anschließend mit biochemischen und spektroskopischen Methoden charakterisieren zu können. Dabei sollte die NMR-Spektroskopie im Mittelpunkt stehen. Zur besseren Interpretierbarkeit der Ergebnisse wurden auch PC-Chromopeptide und Modellchromophore mit in die Untersuchungen einbezogen. Falls es so gelingen sollte, die strukturellen Unterschiede zwischen dem  $P_r'$ - und  $P_{fr}'$ -Chromophor aufzuklären, sollte dann unter Einbeziehung von intaktem Phytochrom versucht werden, anhand der gewonnenen Erkenntnisse Randbedingungen für die  $P_{fr}$ -Absorption und der  $P_r \rightleftharpoons P_{fr}$  Konversion anzugeben.

## II. Resultate und Diskussion

1. Spektrale Eigenschaften des Phytochroms in photo-reversibler und denaturierter Form
- 1.1. UV-Vis und photochemische Eigenschaften des photo-reversiblen Phytochroms

In Abb. 2 sind die Absorptionsspektren von degradiertem, hoch angereichertem Phytochrom (60 KD) wiedergegeben. 2a ist das Spektrum von reinem  $P_r$  und 2b gibt das Spektrum von 2a im photostationären Gleichgewicht bei 660 nm wieder. Nach Butler und al. (1964) und Hartmann (1966) enthält es 20%  $P_r$  und 80%  $P_{fr}$ . Mit dieser Angabe läßt sich aus 2a und 2b das Absorptionsspektrum von reinem  $P_{fr}$  berechnen (siehe exp. Teil Seite 149), das in Abb. 2c wiedergegeben ist. Im ganzen Spektralbereich überlappt es sich mit dem von  $P_r$ , und dies ist die Ursache dafür, daß  $P_{fr}$  durch Belichtung nie rein, sondern immer nur in einer wellenlängenabhängigen Mischung mit  $P_r$  erhalten werden kann. Die  $P_{fr}$ -Konzentration ist im Bereich zwischen 600 und 670 nm maximal (Hartmann, 1966), bei Belichtung mit Wellenlängen größer als 720 nm erhält man  $P_r$  (Abb. 2a) mit einem Restanteil von höchstens 1%  $P_{fr}$ , doch reicht diese Menge bereits aus, um einige der  $P_{fr}$ -abhängigen physiologischen Antworten zu erhalten (Smith, 1975; Colbert et. al., 1983). Pratt und Butler (1970) konnten zeigen, daß bei UV-Bestrahlung eine Photokonversion des Phytochroms stattfindet und diskutierten dafür einen Energietransfer zwischen aromatischen Aminosäuren und dem Chromophor, doch muß auch die bereits erwähnte UV-Absorption des Gallenfarbstoffchromophors mit in Betracht gezogen werden (siehe Abb. 18). Absorptionsspektren von reinem  $P_{fr}$  wurden bereits für 60 KD Phytochrom (Hartmann, 1966), für  $P_{fr}$  von 120 KD (Pratt, 1979) und für 124 KD- $P_{fr}$  (Vierstra und Quail, 1983 b) berechnet. Das berechnete Spektrum in Abb. 2c zeigt die größte Übereinstimmung mit den Daten für 124 KD-Phytochrom. Demnach besitzt  $P_{fr}$  eine relativ scharfe Absorptionsbande im dunkelroten

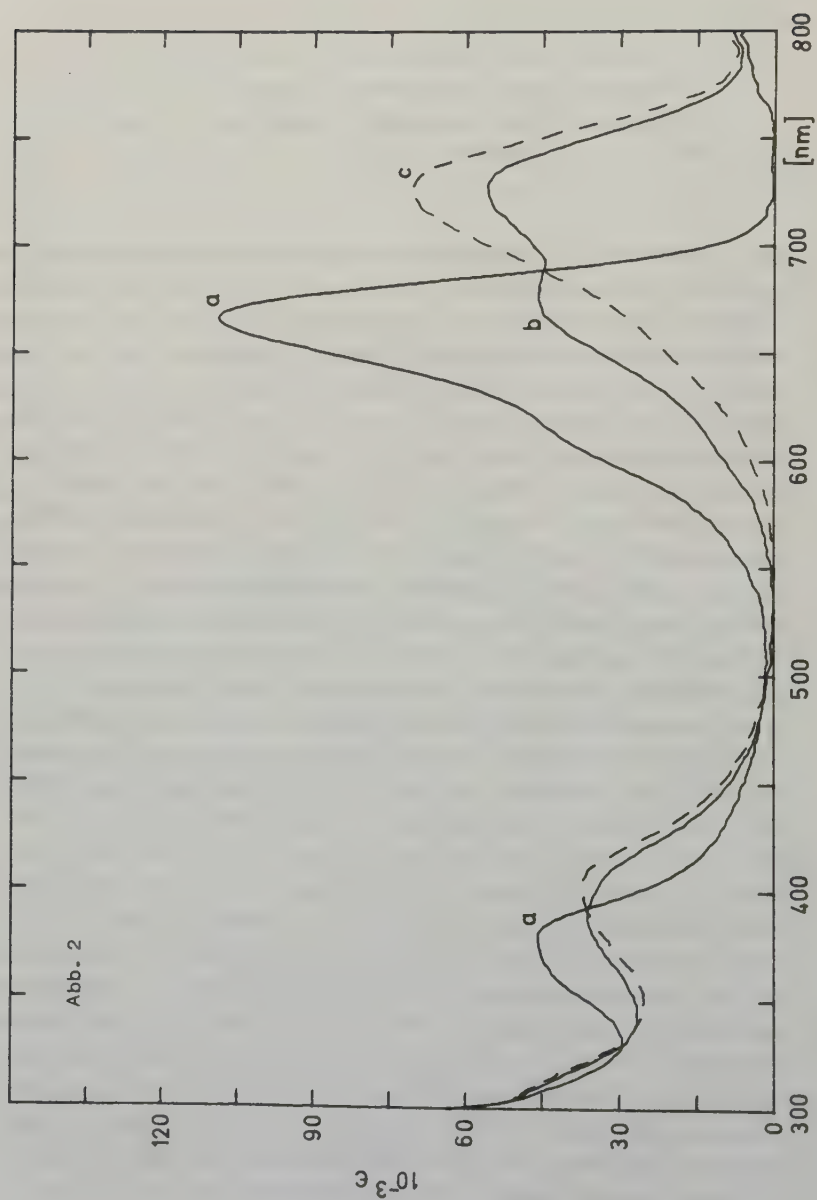


Abb. 2: Absorptionsspektrum von degradiertem Phytochrom,  
60 KD mit  $A_{665}/A_{280} = 0,7$ ;

- a) nach DR-Belichtung ( $P_r$ )
- b) nach HR-Belichtung ( $80\% P_{fr} + 20\% P_r$ , siehe Text)
- c) Berechnetes Absorptionsspektrum für reines  $P_{fr}$   
(siehe exp. Teil, Seite 149)

Spektralbereich, die zu kürzeren Wellenlängen hin verbreitert ist. Im Gegensatz zu den Berechnungen von Hartmann (1966) und Pratt (1979) besitzt reines  $P_{fr}$  nach diesen Daten keine Schulter um 660 nm. Für degradiertes und natives Phytochrom wurden kleine, aber signifikante Unterschiede im Absorptionsverhalten beschrieben (Epel, 1981; Vierstra und Quail, 1982a, 1983 a und b). In Tabelle 1 sind die jeweiligen Spektraldaten für  $P_r$  und das berechnete, reine  $P_{fr}$  zusammengestellt.

Tab. 1: Spektraldaten für reines, natives und degradiertes  $P_r$  und  $P_{fr}$ . Die Angaben in Klammern geben Schultern im Absorptionsspektrum wieder.

|                                    | Phytochrom (Hafer)          |                           |
|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
|                                    | nativ (124 KD) <sup>a</sup> | deg. (60 KD) <sup>b</sup> |
| $\lambda_{\max} P_r$ (nm)          | 379 (615) 666               | 379 (615) 666             |
| $\lambda_{\max} P_{fr}$ (nm)       | 400 730                     | 402 725                   |
| $\epsilon P_r$ (666 nm)            | ?                           | 110000 <sup>c</sup>       |
| $\epsilon P_{fr}$ (730 bzw. 725nm) | 68% von $P_r$               | 71500                     |
| $\epsilon P_{fr}/\epsilon P_r$     | 0,68                        | 0,65                      |

a) Nach Vierstra und Quail, 1983 a und b

b) Daten entnommen aus Abb. 2

c) Nach Brandlmeier et al., 1981 a

Die kleinen Absorptionsunterschiede, speziell die gegenüber  $P_r$  etwas erhöhte und gegenüber  $P_{fr}$  um rund 5 nm längerwelligere Absorption von nativem  $P_{fr}$  führt zu einem unterschiedlichen photochemischen Verhalten von nativem und degradiertem Phytochrom. Die photochemischen Daten für 60, 120 und 124-KD-Phytochrom sind bestimmt worden und werden in Tabelle 2 gegenübergestellt.

Tab. 2: Photochemische Daten von nativem und degradiertem Phytochrom

| Phytochrom | $[P_{fr}]_{\infty}^a$ | $\phi_{P_r}$ | $\phi_{P_{fr}}$ | $\phi_{P_r}/\phi_{P_{fr}}$ | Literatur                       |
|------------|-----------------------|--------------|-----------------|----------------------------|---------------------------------|
| 124 KD     | 0,86                  | 0,17         | 0,10            | 1,76                       | ] Vierstra und<br>Quail, 1983 b |
| 120 KD     | 0,79                  | 0,11         | 0,12            | 0,98                       |                                 |
|            | 0,75                  | -            | -               | 0,98                       | ] Pratt, 1975                   |
| 60 KD      | 0,81                  | -            | -               | 1,50                       |                                 |

a) Konzentration von  $P_{fr}$  im photostationärem Gleichgewicht bei 665 nm

Obwohl zwischen 60 KD- und 120 KD-Phytochrom keine spektralen Unterschiede bestehen (Pratt, 1975), bestehen deutliche Unterschiede im photochemischen Verhalten. Überraschend ist dabei, daß die Daten für 60-KD-Phytochrom mit den Daten für 124-KD-Phytochrom besser übereinstimmen als die für 120 KD-Phytochrom, obwohl dieses nur um ein kurzes Peptidstück kleiner ist als das 124-KD-Phytochrom. Offensichtlich hat im leicht degradierten Phytochrom das zusätzliche, farblose, rund 60 KD große Peptidstück, das im 60-KD-Phytochrom fehlt, eher eine destabilisierende Wirkung auf den  $P_{fr}$ -Chromophor.

## 1.2. UV-Vis Daten des sauer denaturierten Phytochroms

Grombein et al. (1975) konnten zeigen, daß nach saurer De-

naturierung von Phytochrom Chromophorspezies entstehen, die im Vergleich zum intakten Phytochrom grundlegend geänderte spektrale Eigenschaften besitzen. Abb. 3a zeigt das Absorptionsspektrum von  $P_{fr}$  nach Denaturierung mit Ameisensäure (Endkonzentration = 5%, v:v).

In Übereinstimmung mit Grombein et al. (1975) besitzt das Denaturierungsprodukt  $P_{fr}'$  ein Absorptionsmaximum um 600 nm und ist photoreversibel. Bei Belichtung mit Weißlicht revertiert es irreversibel zu einer Chromophorspezies  $P_r'$  (Abb. 3b) mit breitem Absorptionsmaximum um 660 nm, die selbst gegenüber Belichtung stabil ist.  $P_r'$  kann auch direkt über die Denaturierung von  $P_r$  erhalten werden. Grombein et al. (1975) beschrieben für den  $P_{fr}' \rightarrow P_r'$  Übergang Absorptionsänderungen im sichtbaren Spektralbereich. Abb. 3 zeigt aber deutlich, daß auch in der nahen UV-Bande für diesen Übergang Absorptionsänderungen zu beobachten sind. Demnach besitzt  $P_r'$  in diesem Spektralbereich gegenüber  $P_{fr}'$  eine erhöhte Absorption, ohne daß damit eine Verschiebung des Absorptionsmaximums verbunden wäre. Zum Vergleich ist in Abb. 3 auch das ursprüngliche  $P_r$ -Spektrum mit eingezeichnet. Es wird deutlich, daß die blaue Absorptionsbande bei dem Denaturierungsvorgang nur gering beeinflußt wird, wogegen im sichtbaren Spektralbereich eine drastische Absorptionsabnahme zu beobachten ist. So beträgt die Absorptionsintensität von  $P_r'$  und  $P_{fr}'$  hier nur noch ein Drittel der des Phytochroms in der  $P_r$ -Form. Die daraus resultierende Verkleinerung des Intensitätsverhältnisses  $Q_{UV}^{Vis}$  der sichtbaren zu der nahen UV-Absorptionsbande wurde auch bei der Denaturierung von PC beobachtet (Scheer und Kufer, 1977). Nach theoretischen Berechnungen (z.B. Chae und Song, 1975; Sugimoto et al., 1976, Pasternak und Wagnière, 1979); Scheer et al., 1982) ist der  $Q_{UV}^{Vis}$ -Wert ein Sensor für die Konformation der Gallenpigmente. Dies zeigt der Vergleich der Elektronenspektren von Gallenfarbstoffen, die durch intramolekulare Brücken chemisch in einer bestimmten Konformation fixiert sind.

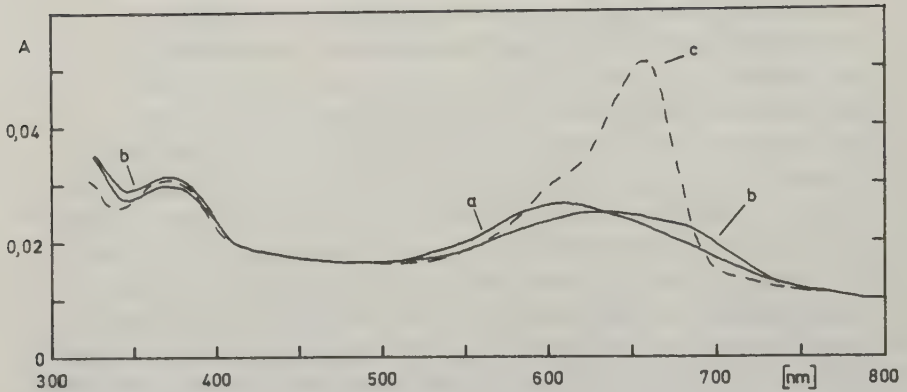


Abb. 3: Absorptionsspektren von Phytochrom (60 KD), denaturiert mit konz. Ameisensäure (Endkonzentration = 5%, v:v)

a)  $P_{fr}$  nach Säurezugabe

b) nach anschließender Bestrahlung mit 10 s Weißlicht

c)  $P_r$ ; Probe a) vor HR-Bestrahlung und Säurezugabe

Abb. 4a zeigt das Elektronenspektrum von  $N_{21}$ - $N_{24}$ -Methylen- Etio-biliverdin (4) (bei saurem und neutralem pH), das eine fixierte zyclisch-helicale Konformation besitzt. In diesem Fall ist der  $Q_{UV}^{Vis}$ -Wert kleiner 1. Im Gegensatz dazu ist für Isophorcabilin (5), ein Gallenfarbstoff, der in ähnlicher Form als Pigment bei Schmetterlingen vorkommt, mit fixierter gestreckter Konformation ein Vielfaches von 1. Das Elektronenspektrum von Isophorcabilin bei saurem und neutralem pH ist in Abb. 4b wiedergegeben. Demzufolge wird bei denaturierten Biliproteinen, die einen kleinen  $Q_{UV}^{Vis}$ -Wert besitzen, eine, für die freien Gallenfarbstoffe charakteristische zyclisch-helicale Konformation

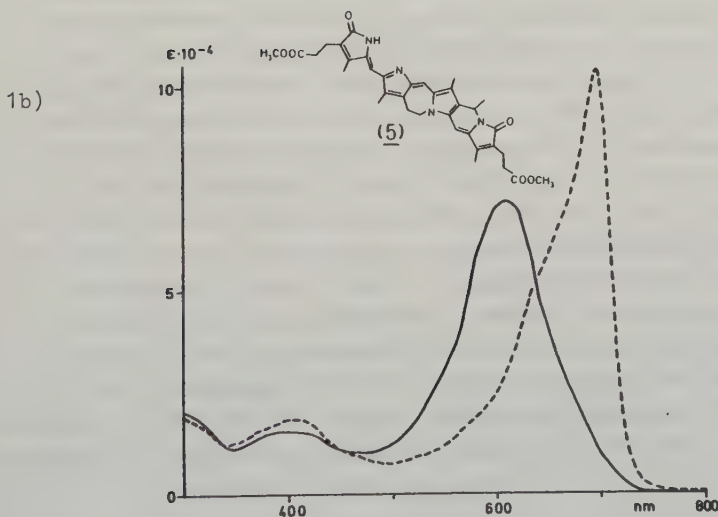
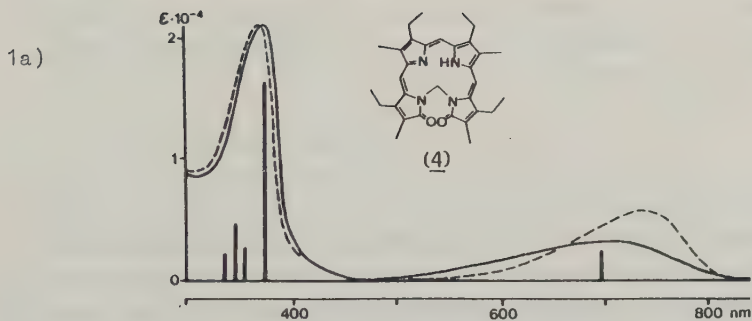


Abb. 4: a) N<sub>21</sub>-N<sub>24</sub>-Methylen-Etiobiliverdin (4) in Chloroform (—) und Chloroform/H<sup>+</sup> (---) (nach Falk und Thirring, 1981)  
 b) Isophorocabilin (5) in Methanol (—) und Methanol/1% HCl (---) (nach Scheer und Kufer, unveröffentlicht)

(Moskowitz et al., 1964) angenommen, während der Chromophor in den nativen Biliproteinen durch Proteineinfluß vermutlich in eine gestreckte Konformation gezwungen wird (Scheer und Kufer, 1977)

## 2. Peptische Chromopeptide von Phytochrom in der $P_{fr}$ -Form

Die Präparation von Chromopeptiden aus Phytochrom in der  $P_r$ -Form erwies sich sehr hilfreich für die Ermittlung der Struktur des peptidgebundenen  $P_r'$ -Chromophor mittels NMR-Spektroskopie (Lagarias und Rapoport, 1980) oder Isolation von freiem Phytochromobilin (Rüdiger et al., 1980). In beiden Fällen wurden sie durch den Abbau von  $P_r$  mit Pepsin bei pH 1,5 - 2,0 nach der Methode von Fry und Mumford (1971) erhalten. Das  $P_r'$ -Chromopeptid hat sehr ähnliche spektrale Eigenschaften wie  $P_r'$  (Brandlmeier et al., 1981b). Beim Abbau von Phytochrom in der  $P_{fr}$ -Form erhielten Fry und Mumford (1971) genau die gleichen Chromopeptide wie beim Abbau von  $P_r$ . Führt man aber den Pepsinabbau von  $P_{fr}$  unter sehr schonenden Bedingungen im Dunklen durch, so erhält man Chromopeptide, die nun ihrerseits genau die gleichen Chromophoreigenschaften wie  $P_{fr}'$  zeigen. In Analogie zu  $P_{fr}'$  ist das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid ebenfalls photosensibel, und bei Belichtung (Weißlicht oder monochromatisches Licht von 600 nm) wird es irreversibel in das  $P_r'$ -Chromopeptid umgewandelt.

### 2.1. Präparation des $P_{fr}'$ -Chromopeptides

Die Schwierigkeiten bei der Präparation des  $P_{fr}'$ -Chromopeptides sind nachfolgend kurz zusammengefaßt:

- $P_{fr}'$  revertiert im Dunklen langsam, temperaturabhängig zu  $P_r'$  zurück.
- Gallenfarbstoffe sind gegenüber Oxidation sehr empfindlich, andererseits lagern sich starke Antioxidantien infolge ihrer Nucleophilie leicht an die mittlere Methinbrücke

an (Falk et al., 1980). Dabei entsteht ein gelbes, rubino-ides Derivat des vorher blauen Gallenfarbstoffes. Gerade die bei der Phytochromisolation eingesetzten SH-Schutzreagenzien, wie Na-Sulfit oder Merkaptoethanol, bilden sehr leicht mit denaturiertem Phytochrom bei höherer Temperatur dieses Produkt.

- c)  $P_{fr}'$  ist äußerst lichtempfindlich. Selbst bei längerer Belichtung mit Sicherheitslicht, das noch einen kleinen Orangeanteil besitzt (siehe exp. Teil, Seite 137) revertiert es irreversibel zu  $P_r$ .

Bei der Suche nach einem geeigneten Oxidationsschutz beim Pepsinabbau erwies sich Ascorbinsäure als äußerst vorteilhaft. Sie reagiert nicht mit dem Chromophor und besitzt speziell auf den  $P_{fr}'$ -Chromophor eine stabilisierende Wirkung. Um einen absoluten Oxidationsschutz zu gewährleisten, wurde vor der Inkubation mit Argon gespült, und zur Verkürzung der Abbaupzeit wurden große Mengen Pepsin zugegeben. Sie betrugen 1/10 des Gesamtproteins (bestimmt über den  $A_{665}/A_{280}$ -Wert; siehe exp. Teil, Seite 139). Angesäuert wurde das Abbaugemisch mit konz. HCl, da diese die spätere Chromatographie der Chromopeptide nicht störte (im Gegensatz zu Ameisensäure, die Fry et al, 1971 zum Ansäuern benutzten) und andererseits Pepsin sein Wirkungsoptimum in 1 M HCl besitzt. Inkubiert wurde das Abbaugemisch dann für eine Stunde bei 37° C im Wasserbad bei völliger Dunkelheit. Unter diesen Bedingungen war der  $P_{fr}'$ -Chromophor (bzw. der Chromophor des  $P_{fr}'$ -Chromopeptides) hinreichend stabil (während des Abbaus wurde nur etwa 5% Reversion des  $P_{fr}'$ -Chromophors zum  $P_r$ -Chromophor festgestellt). Die Vollständigkeit des Abbaus konnte durch komplette Extraktion der hydrophoben Chromopeptide mit n-Butanol/0.05% Trichloressigsäure aus der wässrigen Phase überprüft werden. Fry und Mumford (1971) reinigten das  $P_r$ -Chromopeptid durch Adsorption an Biogel P-4 aus 5proz. Ameisensäure und anschließender Elution mit 25% Essigsäure. Bei eige-

nen Versuchen band das  $P_r'$ -Chromopeptid unter diesen Bedingungen nicht an Biogel-P4, erst bei Ameisensäurekonzentrationen kleiner 1% konnte Adsorption an das Gel erreicht werden. Verdünnte HCl störte diese überhaupt nicht. Das Biogel-P besteht aus Polyacrylpartikeln, die hydrophobe Eigenschaften besitzen (Firmenschrift Biorad). Die Wechselwirkungen zwischen Chromopeptiden, die wegen des Chromophorgehalts ebenfalls einen leicht hydrophoben Charakter haben, und Gelmatrix könnten damit von hydrophobem Charakter sein. Das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid bindet in 2proz. wässriger HCl schwächer als das  $P_r'$ -Chromopeptid, das ebenfalls im Abbaugemisch mit enthalten ist, da einmal  $P_{fr}'$  beim Pepsinabbau etwas zu  $P_r'$  revertiert, zum anderen  $P_{fr}'$  im Photogleichgewicht im Gemisch mit  $P_r$  vorliegt (siehe S.15). So kann bei diesem Chromatographieschritt das  $P_{fr}'$ - vom  $P_r'$ -Chromopeptid abgetrennt werden. Dies ist ein wichtiger Schritt für die weitere Analyse des  $P_{fr}'$ -Chromophors, da auf diese Weise im Gegensatz zu  $P_{fr}'$ , das immer mit  $P_r$  verunreinigt ist, der reine Chromophor untersucht werden kann. Die meisten farblosen Peptidbruchstücke zeigen keine Wechselwirkung mit dem Gel und werden mit der Front eluiert. Bei Verwendung von Biogel-P10 konnte die Abtrennung von farblosen Verunreinigungen vom  $P_{fr}'$ -Chromopeptid noch verbessert werden, da es gegenüber P-4 auch größere Peptidstücke, speziell die Chromopeptide (Ausschlussvolumen P-4 = 4 KD, P-10 = 20 KD) zurückhält. Abb. 5 zeigt ein typisches Elutionsprofil einer  $P_{fr}'$ -Chromopeptid-Chromatographie an P-10. Das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid eluiert in sehr großem Volumen von der P-10 Säule. Durch Wechsel des Elutionspuffers von wässriger 2proz. HCl zu 1proz. wässriger Ameisensäure nach Abtrennen der farblosen Peptide konnte es etwas verringert werden. Im P-10 Elutionspuffer bindet das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid in einer scharfen Bande an Kieselgel und kann so über eine kleine Kieselgelsäule anschließend konzentriert werden. Dies ist sehr vorteilhaft, da das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid während längerwährenden Konzentrierungsschritten (z.B. Gefriertrocknung) zu einem großen Prozentsatz zum  $P_r'$ -Chromopeptid revertiert.

Gleichzeitig können bei der Kieselgelchromatographie noch weitere farblose Verunreinigungen abgetrennt werden. Elution vom Kieselgel kann mit 30proz. Ameisensäure oder Essigsäure, aber auch mit Methanol/0,1% Trichloressigsäure bzw. TFA in kleinem Volumen erzielt werden. In diesen Lösungsmittelsystemen ist das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid bei Eisfachtemperaturen über längere Zeit stabil. Das  $P_r'$ -Chromopeptid, das bei der P-10 Chromato-

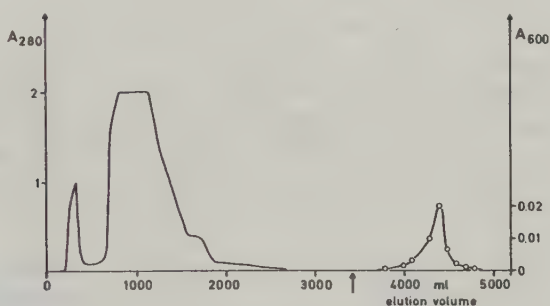


Abb. 5: Elutionsdiagramm der P-10 Chromatographie;

(—)  $A_{280}$ , farblose Peptide

(-o-o-)  $A_{600}$ ,  $P_{fr}'$ -Chromopeptid. Der Pfeil zeigt den Pufferwechsel von verdünnter HCl (pH 2,5) zu 1proz. wässriger Ameisensäure an.

graphie an der Gelmatrix gebunden bleibt, kann mit 2% wässrigem Pyridin gut eluiert werden und kann in einer anschließenden Kieselgelchromatographie ebenfalls konzentriert werden, eluiert vom Kieselgel aber erst mit 50proz. wässriger Ameisensäure. Da P-10 und Kieselgel in wässriger Matrix hydrophobe Eigenschaften besitzen, deutet alles darauf hin, daß das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid gegenüber dem  $P_r$ -Chromopeptid eine größere Polarität besitzt. Die beschriebene Anreicherungsmethode für die Phytochrom-Chromopeptide ist so effektiv, daß als Ausgangsmaterial für die Präparation der Chromopeptide bereits grob angereichertes Phytochrommaterial (Brushitematerial; siehe exp. Teil, Seite 140) eingesetzt werden konnte.

## 2.2. UV-Vis Daten und wichtige Eigenschaften des $P_{fr}'$ -Chromopeptides.<sup>a)</sup>

Die Elektronenspektren von dem  $P_r'$ - und  $P_{fr}'$ -Chromopeptid sind in Abb. 6 wiedergegeben. In 1proz. Ameisensäure hat das  $P_r'$ -Chromopeptid Absorptionsmaxima bei rund 680 nm (mit Schulter bei 630 nm), 380 und 280 nm, das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid besitzt Absorptionsmaxima um 590 nm und ebenfalls bei 380 und 280 nm. Beim Übergang vom  $P_{fr}'$ - zum  $P_r'$ -Chromopeptid wird die nahe UV-Bande nicht verschoben, jedoch ist die Absorption vom  $P_{fr}'$ -Chromopeptid in diesem Spektralbereich geringer als die des  $P_r'$ -Chromopeptids, dafür absorbiert das  $P_r'$ -Chromopeptid im sichtbaren Spektralbereich etwas geringer als das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid. Die kleinen Absorptionsunterschiede zwischen denaturiertem Phytochrom und den entsprechenden Chromopeptiden (vergleiche Abb. 3 und 6) können

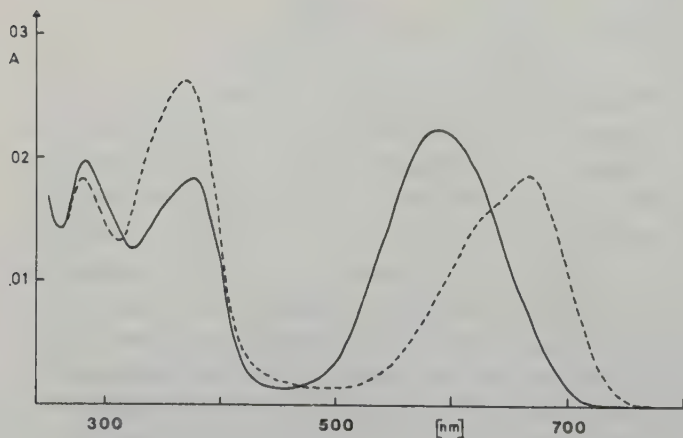
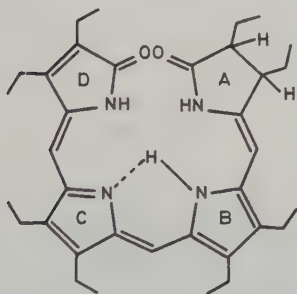


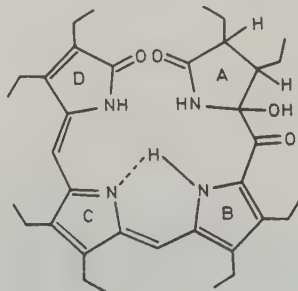
Abb. 6: Absorptionsspektrum von  $P_{fr}'$ -Chromopeptid in 1proz. wässriger Ameisensäure (—) und nach anschließender Bestrahlung mit 10 s Weißlicht =  $P_r'$ -Chromopeptid (----)

<sup>a)</sup> Die UV-Vis Spektroskopieuntersuchungen am  $P_{fr}'$ -Chromopeptid wurden bereits in der Diplomarbeit durchgeführt, und die Ergebnisse dieser Messungen sind bei Thümmeler et al. (1981) publiziert. Da sie für das Verständnis der folgenden Kapitel wichtig sind, werden sie kurz zusammengefaßt.

durch restliche Protein-Chromophor-Wechselwirkungen im denaturierten Protein erklärt werden, die durch Proteolyse aufgehoben werden. Da  $P_{fr'}$  gegenüber  $P_r'$  um rund 60 nm kürzerwelliger absorbiert, wurde angenommen, daß das konjugierte System bei  $P_{fr'}$  um eine Doppelbindung kürzer ist als bei  $P_r'$  (Grombein et al., 1975). Zu einer Verkürzung des Konjugationssystems kann es bei den A-Dihydrobilidionen durch Oxidation der, gegenüber elektrophilem Angriff sehr empfindlichen, C-5 Methinbrücke kommen (Krauss und Scheer, 1981). Am Modellchromophor Dihydrookoethylbiliverdin (kurz DHOEBV) (6), der mit Ausnahme der Vinylgruppe das gleiche Konjugationssystem wie der peptidgebundene Phytochromchromophor besitzt (vergleiche mit (1a)), untersuchte Krauss (1980) diese regioselektive Redoxreaktion. Sie konnte



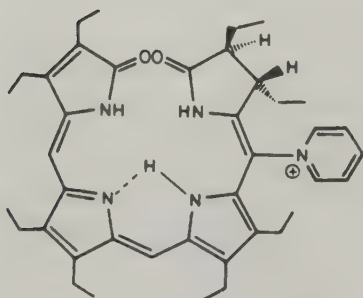
(6)



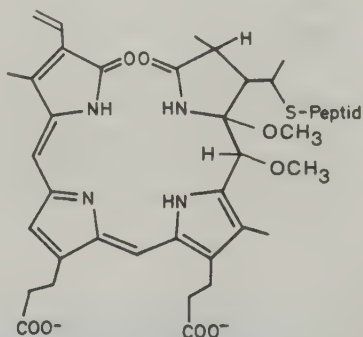
(7)

nachweisen, daß bei aerober Photoxidation von DHOEBV Purpurine entstehen (z.B. (7)), bei denen die  $\Delta 4,5$  Doppelbindung durch Oxigenierung verlorengegangen ist. Bei anaerober Oxi-

dation mit  $J_2$  in Gegenwart von einem nucleophilen Reaktionspartner, wie z.B. Pyridin, entstehen durch Anlagerung dieses Reaktionspartners an die C-5 Methinbrücke Violinderivate des DHOEBV. Das Pyridinderivat (8) entsteht durch nucleophile Addition des Pyridin an die, durch die Oxidation mittels  $J_2$



(8)

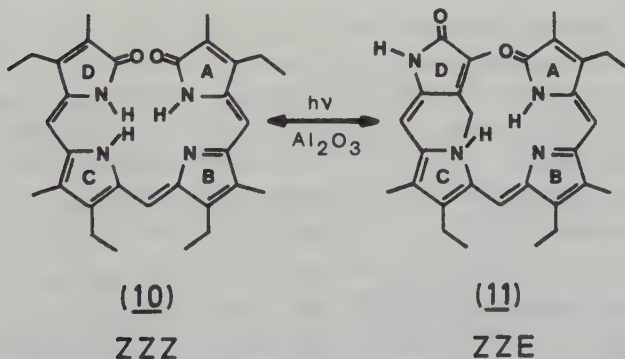


(9)

in ihrer Reaktivität "umgepoolten", C-5 Methinbrücke. In diesem Fall ist zwar die  $\Delta$  4,5 Doppelbindung nicht verschwunden, sie ist aber trotzdem spektroskopisch unwirksam ( $\lambda$  max des Pyridinviolins = 605 nm). Die Ursache dafür ist das Herausdrehen der betroffenen Doppelbindung aus der Konjugationsebene, die durch die Pyrrolringe BCD gebildet wird, wegen sterischer Hindernissen des Donors mit den benachbarten Pyrrolringen A und B. In Gegenwart von  $J_2$  entsteht bei Belichtung von  $P_r$ -Chromopeptid, das in Methanol gelöst ist, ein Methanoladdukt (9). Bei diesem Violin ist die  $\Delta$  4,5 Doppelbindung durch die Anlagerung des Methanols an das C-4 und C-5 verlorengegangen. Im roten Spektral-

bereich stimmen die spektralen Eigenschaften der Violine mit denen des  $P_{fr}'$ -Chromophors sehr gut überein. Aufgrund dieser Versuchsergebnisse formulierten Krauss und Scheer (1981) eine Modellreaktion für die  $P_r \leftrightarrow P_{fr}$  Photokonversion. Sie beinhaltet eine reversible Anlagerung eines nucleophilen Aminosäurerestes, wie z.B. Tryptophan, an die C-5 Methinbrücke nach vorangegangener Oxidation mittels einer Disulfidbrücke. Eine gewisse experimentelle Stütze hatte dieses Modell durch die Beobachtung von Hunt und Pratt (1981), daß in  $P_{fr}$  eine SH-Brücke leichter zugänglich ist als in  $P_r$ .

Eine von Falk und Grubmayr (1977) erstmals beschriebene Reaktion führt ebenfalls zur Verkürzung des Konjugationssystems bei Gallenfarbstoffen. Sie beobachteten, daß bei Belichtung der an Aluminiumoxid adsorbierten, im Grundzustand ZZZ-konfigurierten Biline (z.B. Etiobiliverdin (10)) relativ stabile ZZE-Stereoisomere (11) entstehen (die Bezeichnung ZZZ bzw. ZZE bezieht sich auf die Konfiguration der 5,10,15 Methindoppelbindungen in dieser Reihenfolge). Der E-isomere Chromo-



phor absorbiert rund 50 bis 100 nm kürzerwelliger als der korrespondierende ZZZ-Chromophor. Dies wurde durch partielle Entkopplung der E-isomeren Doppelbindung vom restlichen Chromophoren System erklärt (Falk und Höllbacher, 1978). Wie bei den Violinen ist sie Folge einer sterischen Hinderung. In diesem Fall behindert sich die, der betroffenen Methinbrücke benachbarte  $\beta$ -Seitengruppe mit der H-N< Funktion des gegenüberliegenden Pyrrolringes (z.B. die C-17-Ethylgruppe mit dem H-Atom an Stickstoff N<sub>23</sub> des Ringes C beim ZZE-Isomer (11)). Im Gegensatz zu den Violinen sind die E-isomeren Gallenfarbstoffe wie das P<sub>fr</sub>'-Chromopeptid lichtempfindlich. Bei Belichtung revertieren sie irreversibel zu den ZZZ-Ausgangsprodukten zurück. In Analogie zum Phytochromchromopeptid erfährt dabei die Absorption der Probelösung im sichtbaren Spektralbereich eine bathochrome Verschiebung, während im nahen UV lediglich eine hyperchrome Absorptionsänderung zu beobachten ist. Im Gegensatz dazu ist bei den Violinen die nahe UV-Bande bei nahezu unveränderter Absorptionsintensität 20 bis 40 nm hypsochrom verschoben. In Tabelle 3 sind die Spektraldaten der Phytochromchromopeptide und einiger Modellchromophore zusammengestellt.

Tab. 3: Spektraldaten der Phytochromchromopeptide und von Modellchromophoren

| Substanz                                             | $\lambda$ max (nm) |     | Lösungsmittel           |
|------------------------------------------------------|--------------------|-----|-------------------------|
| P <sub>r</sub> '-Chromopeptid (1a) <sup>a</sup>      | 660                | 380 | Methanol/H <sup>+</sup> |
| P <sub>fr</sub> '-Chromopeptid <sup>a</sup>          | 610                | 380 | Methanol/H <sup>+</sup> |
| Methanoladdukt (9) <sup>a</sup>                      | 600                | 335 | Methanol/H <sup>+</sup> |
| ZZZ-Etiobiliverdin-IV <sub>x</sub> (10) <sup>b</sup> | 650                | 380 | Chloroform              |
| ZZE-Etiobiliverdin IV <sub>x</sub> (11) <sup>b</sup> | 600                | 380 | Chloroform              |
| DHOEBV (6) <sup>c</sup>                              | 665                | 351 | Methanol/H <sup>+</sup> |
| Pyridinaddukt (8) <sup>d</sup>                       | 603                | 327 | Methanol/H <sup>+</sup> |
| Purpurin (7) <sup>d</sup>                            | 605                | 337 | Methanol/H <sup>+</sup> |

a) Thümler et al., 1981; b) Falk et al., 1980; c) Scheer, 1976;

d) Krauss, 1980

Zur näheren Prüfung der Eigenschaften der E-isomeren Gallenfarbstoffe im Vergleich zum  $P_{fr}'$ -Chromopeptid wurde als nächstes versucht, nach der Methode von Falk et al. (1980) E-isomere Gallenfarbstoffe herzustellen. Dafür standen OEBV (12)<sup>a</sup> und DHOEBV (6)<sup>a</sup> zur Verfügung. Wenn möglich sollte versucht werden, diese Reaktion auf die PC- und  $P_r'$ -Chromopeptide anzuwenden, da diese wegen ihrer Struktur und Wasserlöslichkeit ein wesentlich besseres Modell für das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid darstellen.

### 3. ZZE-konfigurierte Gallenfarbstoffe als Modell für den $P_{fr}'$ -Chromophor

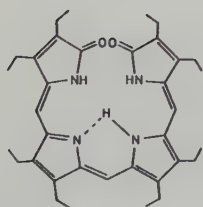
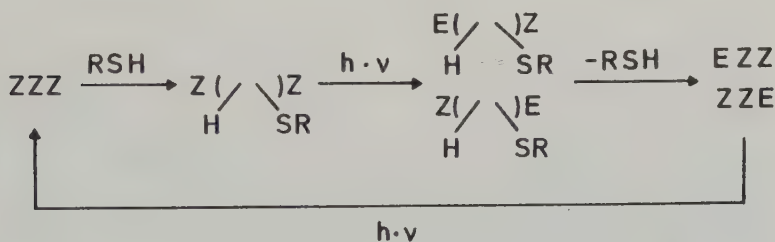
Für die Vielzahl der Pyrrolpigmente wurde E-Z-Isomerisierung an den Methindoppelbindungen zuerst an Dipyrrolen beobachtet (Falk et al., 1975; Gossauer et al., 1976). Falk et al. (1978a) konnten zeigen, daß bei bichromophoren Systemen die beiden Chromophorhälften, die nur über Einfachbindungen miteinander verknüpft sind und zwei voneinander unabhängige Konjugationssysteme besitzen, sich in ihrem photochemischen Verhalten gegenseitig nicht beeinflussen. Aus diesem Grund konnten für Rubine, die ein solches bichromophores System darstellen, photochemische cis-trans-Isomerisierungen an den Methindoppelbindungen nachgewiesen werden (zusammengefaßt bei Braslavsky et al., 1983). Bei den integralen, voll durchkonjugierten Gallenfarbstoffen, bei denen die beiden Chromophorhälften (Pyrromethenone) demselben  $\pi$ -Elektronensystem ange-

- 
- a) Die Versuche mit den Modellchromophoren wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Kufer durchgeführt. Für die Überlassung größerer Mengen an OEBV und DHOEBV danke ich Herrn Prof. Scheer und Herrn Dr. Kufer sehr herzlich.

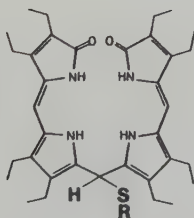
hören, überwiegt strahlungslose Desaktivierung wegen der Möglichkeit eines intramolekularen Protonenaustausches (zwischen  $N_{22}$  und  $N_{23}$  (2a)), und wegen der großen Zahl an konformativen Freiheitsgraden dieser Moleküle (Braslavsky et al., 1983). Es ist nicht möglich, diese in Lösung zu photoisomerisieren. Falk et al. (1980) gelang es aber dennoch, stabile E-Isomere von Bilatrienen-abc herzustellen. Dazu müssen diese zuerst reversibel in ihre rubinoiden Derivate überführt werden, die, wie oben ausgeführt, leicht photoisomerisiert werden können. Rubinoiden Derivate können durch Anlagerung von Nucleophilen an das C-10 des Bilatriens-abc hergestellt werden (Falk et al., 1980; Kufer und Scheer, 1982). Durch Adsorption an  $Al_2O_3$  oder  $SiO_2$  (Falk und Grubmayr, 1977; Falk et al., 1978b) war eine ähnliche Reaktion möglich, da in diesem Fall offensichtlich eine Anlagerung freier -OH-Gruppen des Adsorbens an das C-10 der Gallenpigmente erfolgt (Falk et al., 1980). Nach Einstrahlung von Licht, das die Bilirubinderivate maximal absorbieren ( $\lambda_{max}$  rund 420 nm; Kufer und Scheer 1982; Rotlichtbestrahlung führt nicht zur Photoisomerisierung!) und anschließende Eliminierung des nucleophilen Donors bzw. Desorption von der Gelmatrix, konnten von den ursprünglich ZZZ-konfigurierten Chromophoren ZZE- und in kleinen Spuren EZE-konfigurierte Gallenfarbstoffe abgetrennt werden. Überraschenderweise zeigen nun die E-konfigurierten Gallenpigmente gegenüber den Z-konfigurierten eine ausgesprochen hohe photochemische Reaktivität (zur Diskussion der Selektivität der E-Z-Isomerisierung bei den Bilatrienen-abc, siehe Kap. II.6. ). Schon ein kurzer Lichtblitz in das langwellige Absorptionsmaximum (roter Spektralbereich!) der E-konfigurierten Isomere bewirkt die Rückisomerisierung zu den ursprünglichen, gegen weitere Belichtung stabilen, Z-Formen.

### 3.1. Herstellung ZZE-konfigurierter Gallenfarbstoffchromophore

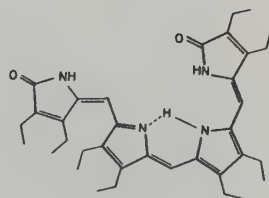
Die Hauptschritte bei der Herstellung stereoisomerer Gallenfarbstoffe sind in Abb. 7 schematisch dargestellt, und als Strukturbeispiele sind die jeweiligen Formen des OEBV mit angegeben (ZZZ (12), rubinoides Zwischenprodukt (13), ZZE (14)). Die Schritte bestehen aus Addition des Nucleophils an C-10, Photoisomerisierung des rubinoiden Zwischenproduktes und zuletzt Eliminierung des Nucleophils. Da die E-Isomeren Chromophore lichtempfindlich sind, ist es notwendig, die Eliminierung des Nucleophils und die anschließende Auftrennung des Isomerengemisches im Sicherheitslicht (siehe exp. Teil, Seite 137) durchzuführen.



(12)



(13)



(14)

Abb. 7: Reaktionssequenz für die Präparation E-konfigurierter Bilindione aus "normalen" Z-Bilindionen. Das Nucleophil RSH wird reversibel am C-10 angelagert.

### 3.1.1. Präparation ZZE-konfigurierter Modellchromophore

Die Isomerisierung von OEBV und DHOEBV wurde nach der Vorschrift von Falk et al. (1980) mit kleinen Modifizierungen durchgeführt. Die Vorschrift von Falk et al. besteht in der Anlagerung des Nucleophils Merkptoethanol an den in DMSO gelösten Gallenfarbstoff (in DMSO liegt das Gleichgewicht der nucleophilen Addition an das C-10 deutlich auf der Seite der Anlagerung; Falk et al., 1980) und in dem Eliminieren des Merkptoethanols nach der Belichtung durch Überführen des Chromophors in Chloroform und Ausschütteln des Merkptoethanols aus der organischen Phase mit verdünnter KOH.

Da die Dihydrobilindione wesentlich reaktivere Chromophore darstellen als die völlig ungesättigten Systeme, wie z.B. OEBV (Scheer, 1981), war es notwendig die Präparation der E-Isomere unter möglichst schonenden Bedingungen durchzuführen. Diese waren: kurze Belichtung (10 min mit 1 000 Watt Halogenlampe) der Probe unter Argonatmosphäre im Eisbad, Filterung des Lichts durch ein 5 cm Wasserschicht (Wärmeschutz) und Ausschütteln des Merkptoethanol nicht mit verdünnter KOH, sondern mit dest. Wasser. Weiterhin stellte sich heraus, daß für eine quantitative Addition des Merkptoethanols an DHOEBV eine deutlich erhöhte Konzentration des Nucleophils nötig war (10% im Falle des OEBV, 25% im Falle des DHOEBV; v:v). Trotz dieser schonenderen Versuchsbedingungen entstanden mit DHOEBV sehr viele, vor allem violett gefärbte Nebenprodukte, die nicht weiter untersucht wurden. Die Ausbeute an E-Isomeren betrug nur 4% (bezogen auf die eingesetzte Chromophormenge), wogegen sie mit OEBV mit rund 35% dem publizierten Wert entsprach.

Im Gegensatz zu verdünnter KOH kann mit dest.  $H_2O$  Merkptoethanol nicht quantitativ aus der Chloroformphase entfernt werden. Dies war aber notwendig, da dieses auch in geringen Konzentrationen beim Konzentrieren der Probe erneut am C-10 anlagert und dabei offensichtlich eine Chemoreversion der E- zu den Z-Isomeren bewirkt (ähnlich wie Dithionit beim  $P_{fr}$ -Chromopeptid; Thümmeler et al., 1981).

Eine quantitative Entfernung des Merkptoethanol konnte durch anschließende Säulenchromatographie der gewaschenen Chloroformphase an mit Chloroform äquilibriertem Kieselgel erzielt

werden. Beim Spülen mit Chloroform bindet der E-konfigurierte Chromophor stärker an die Kieselgelmatrix und Merkaptotoethanol und die Hauptmenge an Z-konfiguriertem Chromophor werden dabei abgetrennt. Das gebundene E-Isomer kann dann mit einer Chloroform/Methanol-Mischung (100/1) in einem kleinen Volumen eluiert werden. Durch anschließende Dünnschichtchromatographie an Kieselgel können vom E-Isomer das restliche Z-Ausgangsprodukt und die verbliebenen Nebenprodukte abgetrennt werden.

### 3.1.2. Präparation ZZE-konfigurierter Phycocyanin-Chromopeptide

Die PC-Chromopeptide wurden durch Pepsinabbau (analog wie beim Abbau von Phytochrom) von C-Phycocyanin gewonnen und analog wie bei der Präparation der Phytochromchromopeptide über eine Biogel-P-10-Säulenchromatographie von den farblosen Peptidbruchstücken abgetrennt. C-Phycocyanin wurde aus der Blaualge Spirulina maxima<sup>a</sup> isoliert (siehe Exp. Teil, Seite 145). Wie das  $P_r'$ -Chromopeptid, bindet das ZZZ-Chromopeptid an die P-10-Matrix und kann nach intensivem Spülen mit verdünnter HCl mit 2proz. wässrigem Pyridin in relativ kleinem Volumen von der P-10-Säule eluiert werden. Bei anschließender isoelektrischer Fokussierung des P-10-Eluates wurden vier Haupt- und fünf Nebenfraktionen der blau gefärbten PC-Chromopeptide, die sich nur in der Aminosäurezusammensetzung ihrer Peptidketten unterscheiden, erhalten. Isoelektrischer Punkt (IEP) und die Aminosäurezusammensetzung sind in Tabelle 4 angegeben. Die E-Z-Isomerisierung der PC-Chromopeptide erfolgte dann analog dem Schema, das in Abb. 7 wiedergegeben ist. Aufgrund der Wasserlös-

---

a) Herrn Prof. Scheer danke ich herzlich für die Überlassung größerer Mengen an Spirulina maxima.

Tabelle 4: Isoelektrische Punkte (IEP) und Aminosäureanalyse der PG-Chromopeptidfraktionen nach Isoelektrischer Fokussierung. Die Werte sind molare Relationen bezogen auf Lys oder, wenn dieses nicht gegenwärtig ist, Ala, Leu oder Ileu (unterstrichen)

|                     | Fraktionsnummer |      |      |      |                 |      |      |      |      |
|---------------------|-----------------|------|------|------|-----------------|------|------|------|------|
|                     | 1               | 2    | 3    | 4    | 5               | 6    | 7    | 8    | 9    |
|                     | 3,5             | 3,6  | 3,8  | 3,9  | IEP (pH)<br>4,1 | 4,2  | 4,4  | 5,1  | 6,3  |
| CySO <sub>3</sub> H | 0,33            | +    | 0,51 | +    | +               | 0,19 | 0,13 | 0,39 | 0,36 |
| Asx                 | 1,13            | 1,92 | 2,41 | 2,36 | 2,44            | 0,8  | 1,93 | 1,62 | 1,43 |
| Thr                 | 0,33            | 0,54 | 1,24 | 1,22 | 0,13            | 0,5  | 0,60 | 0,13 | 1,85 |
| Ser                 | 0,71            | 0,61 | 2,86 | 1,92 | 1,12            | 0,56 | 1,60 | 0,52 | 2,76 |
| Glx                 | 0,38            | 0,42 | 3,08 | 1,83 | 2,7             | 1,1  | 1,77 | 0,88 | 1,88 |
| Gly                 | 1,09            | 1,5  | 4,6  | 4,47 | 2,8             | 1,2  | 2,23 | 1,33 | 2,40 |
| Ala                 | 1,0             | 1,57 | 2,49 | 3,05 | 0,56            | 1,5  | 1,20 | 1,41 | 5,03 |
| Cys                 | 1,44            | -    | 2,39 | -    | -               | -    | 1,26 | 1,02 | 4,16 |
| Val                 | 0               | 1,00 | 0    | 0,24 | 0,7             | 0,36 | 0    | 0    | 0    |
| Met                 | 0               | -    | 0    | -    | +               | +    | 0    | 0,8  | 1,17 |
| Ile                 | 0,38            | 1,00 | 1,18 | 1,31 | 0,5             | 0,19 | 0,43 | 0,40 | 0,35 |
| Leu                 | 0,41            | 0,69 | 1,57 | 1,52 | 1,53            | 1,0  | 1,26 | 0,17 | 1,97 |
| Tyr                 | 0,03            | 0,04 | 0,32 | 0,19 | +               | 0,11 | 0,20 | 0,37 | 1,60 |
| Phe                 | 0,06            | 0,05 | 0,24 | 0,19 | +               | 0,19 | 0,20 | 0,05 | 0,22 |
| His                 | 0,08            | 0,05 | 0,51 | 0,36 | 0,51            | 0,16 | 0,50 | 0,10 | 0,43 |
| Lys                 | 0,17            | 0,13 | 1,00 | 1,00 | 1,0             | 0,32 | 1,0  | 1,0  | 1,0  |
| Arg                 | 0,05            | 0,04 | 0,36 | +    | 0,93            | +    | 0,83 | 0,93 | 0,13 |

- = nicht bestimmt + = in Spuren nachgewiesen

lichkeit der Chromopeptide konnte die Vorschrift für die Isomerisierung der Modellchromophore auf diese nicht angewandt werden. Es zeigte sich jedoch, daß Merkaptoethanol in wässriger Lösung ebenfalls reversibel an das C-10 der Chromophore anlagert und nach Belichtung der Probelösung einfach und quantitativ durch Adsorption der Chromopeptide an Biogel P-10 und Kieselgel wieder abgetrennt werden kann. Dabei war die Stabilität des PC-Chromophors (1b) in wässriger Lösung wesentlich höher als die des Dihydro-Modellchromophors in den organischen Lösungsmitteln, so daß, bezogen auf die eingesetzte Menge, die Ausbeute an ZZE-Chromopeptid (18%) mehrfach größer war als die Ausbeute an ZZE-DHOEBV (4%). Bei den Chromopeptiden erfolgte eine optimale Anlagerung des Merkaptoethanols an den Chromophor in einer Mischung aus 40% Merkaptoethanol und 60% Tris- bzw. Kaliumphosphatpuffer/pH 8 (v:v). Die Abtrennung des Merkaptoethanols nach der Belichtung (analog wie bei den Modellchromophoren) und das Auftrennen des Isomerengemisches erfolgte in einem Schritt durch Säulenchromatographie der Probe an Biogel P-10. Dazu wurde die Probe zuerst mit HCl angesäuert (dies hat die Eliminierung des Merkaptoethanols vom Chromophor zur Folge) und auf eine mit verdünnter HCl äquilibrierten P-10-Säule aufgetragen. Beim Spülen mit verdünnter HCl bindet das ZZZ-Chromopeptid fest an die Gelmatrix, Merkaptoethanol und violette Nebenprodukte eluieren an der Front, während die ZZE-Chromopeptide etwas zurückgehalten werden und so nach weiterem Spülen in einer reinen Fraktion erhalten werden können. Damit zeigen die ZZE- und ZZZ-Chromopeptide in ihrem chromatographischen Verhalten eine sehr große Übereinstimmung mit den  $P_{fr}'$ - und  $P_r'$ -Chromopeptiden. Wie das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid kann das ZZE-PC-Chromopeptid dann in einer anschließenden Kieselgelchromatographie konzentriert und weiter gereinigt werden.

Diese Reaktionssequenz wurde sowohl mit einem PC-Chromopeptidgemisch als auch mit einzelnen Chromopeptidfraktionen durchgeführt, und es wurden in beiden Fällen gleiche Ergebnisse erzielt. Dies zeigt, daß die an den Chromophor kovalent gebundene Peptidkette auf die E-Z-Isomerisierung des Chromophors keinen Einfluß hat und das chromatographische Verhalten der Chromopeptide beim Auftrennen des Isomerengemisches durch die Konfiguration des Chromophors bestimmt wird.

### 3.1.3. Darstellung eines E-konfigurierten Chromopeptides aus dem $P_r'$ -Chromopeptid

Als sehr viel schwieriger erwies sich der Versuch, eine E-Z-Isomerisierung ausgehend vom  $P_r'$ -Chromopeptid durchzuführen, da der  $P_r'$ -Chromophor in der Gegenwart der hohen Merkaptoethanolkonzentrationen gegenüber Belichtung wesentlich instabiler ist (wahrscheinlich wegen der reaktiven Vinylgruppe) und das E-isomere Chromopeptid von den violetten Nebenprodukten nicht vollständig abgetrennt werden kann. Die Gegenwart eines E-isomeren  $P_r'$ -Chromopeptides, nach der Anwendung der für die PC-Chromopeptide beschriebenen Reaktionsfolge auf das  $P_r'$ -Chromopeptid, kann an den typischen Spektralschiebungen im Differenzspektrum nachgewiesen werden, das bei Belichtung des gewonnenen Chromopeptidgemisches gemessen wird (Abb. 10).

### 3.2. Eigenschaften der E-konfigurierten Gallenfarbstoffchromophore im Vergleich zu den Eigenschaften des $P_{fr}'$ -Chromophors

An Hand der E-konfigurierten Modellchromophore und Chromopeptide sollte überprüft werden, inwieweit die Eigenschaften der E- und Z-konfigurierten Chromophore mit den Eigenschaften vom  $P_{fr}'$ - und  $P_r'$ -Chromopeptid übereinstimmen. Für die E-

konfigurierten Bilindione wurde eine Unbeständigkeit in protonenhaltigen Medien berichtet (Falk und Grubmayr, 1979), wogegen nach Grombein et al. (1975) der  $P_{fr}'$ -Chromophor nur in protonenhaltigen Medien stabil ist und beim Übergang zu neutralem pH zum  $P_r'$ -Chromophor revertiert.

Bei den Versuchen mit OEBV und DHOEBV waren die E-konfigurierten Chromophore in neutralen und leicht sauren (1% TFA in Chloroform, v:v) Medien in etwa gleich stabil, in starker Säure (reine TFA) erfolgte allerdings innerhalb weniger Sekunden Reversion zu den korrespondierenden Z-Formen. Ganz anders verhielt sich in dieser Hinsicht das E-konfigurierte PC-Chromozeptid. Wie das  $P_{fr}'$ -Chromozeptid war es auch in starken Säuren (z.B. 50% Ameisensäure) stabil. Die gute Übereinstimmung der spektralen Eigenschaften der E-konfigurierten Modellchromophore in protonenhaltigen, apolaren Lösungsmitteln und der E-konfigurierten PC-Chromozeptide in wässrigen Medien bei niedrigem pH zeigen die Abbildungen 8 und 9. In Abb. 8 sind die Absorptionsspektren von ZZE-OEBV (14) vor und nach Weißlichtbestrahlung wiedergegeben, Abb. 9 zeigt die entsprechenden Spektren vom E-konfigurierten PC-Chromozeptid in 20proz. wässrigem Pyridin, angesäuert mit TFA. Charakteristisch für die E-Isomeren ist die, gegenüber den Z-Formen 50 bis 90 nm hypsochrom verschobene, aber erhöhte Absorption im sichtbaren Spektralbereich und eine nicht verschobene, aber dafür deutlich verringerte Absorption in der nahen UV-Bande. Abb. 8 zeigt, daß beim E→Z Übergang auch in der UV-Bande deutliche Absorptionsänderungen auftreten. Die ausgezeichnete Übereinstimmung der spektralen Eigenschaften der E-Z-isomeren Modellchromophore und PC-Chromozeptide bei niedrigem pH mit den spektralen Eigenschaften vom  $P_{fr}'$ - und  $P_r'$ -Chromozeptid wird beim Vergleich der Abbildungen 8 und 9 mit der Abb. 6 deutlich, die die Absorptionsspektren vom  $P_r'$ - und  $P_{fr}'$ -Chromozeptid in 1proz. wässriger Ameisensäure wiedergibt.

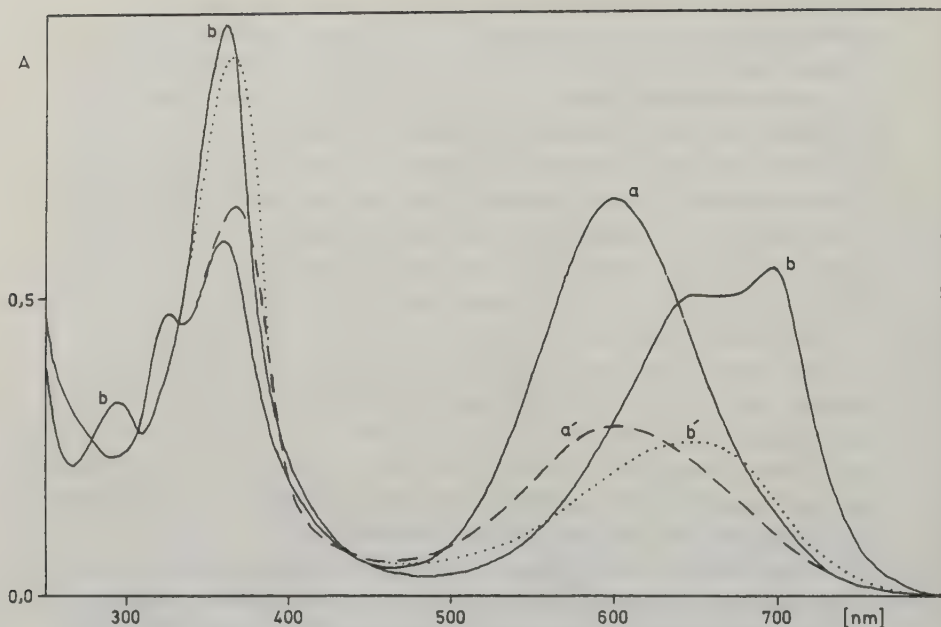


Abb. 8: Absorptionsspektren von E-OEBV in Chloroform/1% TFA (a) und nach 10 s Weißlichtbestrahlung (b) = Z-OEBV; E-OEBV in reinem Chloroform (a') und nach 10 s Weißlichtbestrahlung (b') = Z-OEBV

Daß auch bei der Z-E-Isomerisierung von  $P_{fr}'$ -Chromopeptid eine Chromopeptidspezies entsteht, die analoge spektrale und photochemische Eigenschaften wie das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid besitzt, zeigt Abb. 10. Sie gibt die Differenzspektren wieder, die bei der Belichtung von  $P_{fr}'$ -Chromopeptid, E-PC-Chromopeptid und E- $P_{fr}'$ -Chromopeptid gemessen werden können.

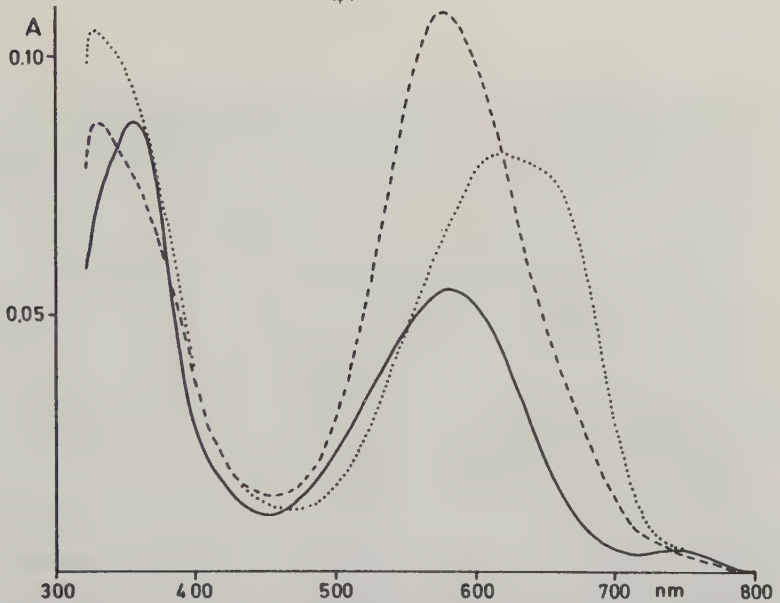


Abb. 9: Absorptionsspektrum von E-konfiguriertem PC-Chromopeptid in 20proz. wässrigem Pyridin(—), angesäuert mit TFA (---) und anschließender Bestrahlung mit 10 s Weißlicht (.....) = Z-PC-Chromopeptid.

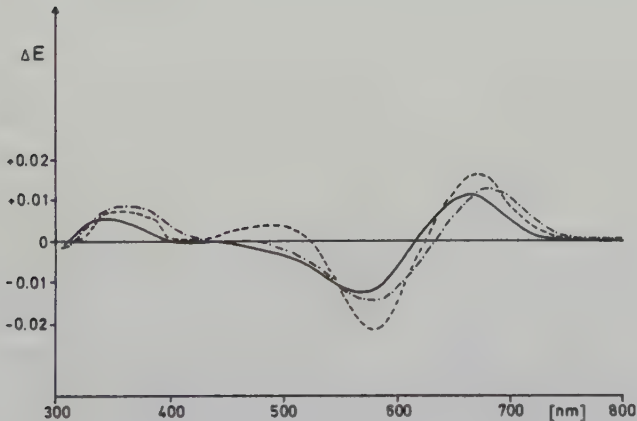


Abb. 10: Absorptionsdifferenzspektren von E- und Z-konfiguriertem Chromopeptiden (E minus Z) aus Phycocyanin (—) und Phytochrom ( $P_r$ ) (---) im Vergleich zum Absorptionsdifferenzspektrum von  $P_{fr}'$ - und  $P_r'$ -Chromopeptid ( $P_{fr}'$ - minus  $P_r'$ - Chromopeptid) (-.-.-).

Zum Vergleich sind in Tabelle 5 die Spektraldaten der Phytochromchromopeptide den Spektraldaten von Z- und E-isomeren PC-Chromopeptiden und Modellchromophoren gegenübergestellt.

Tabelle 5: Absorptionsmaxima der E-Z-Isomeren von Chromopeptiden und Modellbilidionen im Vergleich zu den Phytochromchromopeptiden

| Substanz                  | E-Isomer<br>$\lambda_{\max}$ (nm) | Z-Isomer<br>$\lambda_{\max}$ (nm) | Lösungs-<br>mittel |
|---------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
| Phytochromchromopeptide   | 590,378 <sup>a</sup>              | 665,372 <sup>b</sup>              | c                  |
| Phycocyanin-Chromopeptide | 575,340                           | 630,340                           | d                  |
| DHOEBV                    | 570                               | 655                               | e                  |
| OEBV                      | 598,362                           | 693,362                           | f                  |

a)  $P_{fr}'$ -Chromopeptid b)  $P_r'$ -Chromopeptid c) 1% HCOOH in H<sub>2</sub>O  
d) 50% HCOOH in H<sub>2</sub>O e) HCl in Aceton f) 1% HCl in Methanol.

Die etwas unterschiedliche Lage der Absorptionsmaxima der einzelnen Substanzen und die Größe der spektralen Verschiebungen hängen mit den unterschiedlichen Längen der Konjugationssysteme zusammen. Die Absorptionsbanden der Gallenfarbstoffe zeigen eine deutliche Lösungsmittelabhängigkeit. Dies machen die Spektraldaten der Phytochromchromopeptide in verschiedenen Lösungsmittelsystemen deutlich (vergleiche Tabelle 3 und 5). Dieser Problemkreis wird in Kapitel II.4.2. näher behandelt. Da nun der peptidgebundene, E-konfigurierte Gallenfarbstoffchromophor des PC-Chromopeptides die gleiche Beständigkeit gegenüber Säure wie das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid zeigte, wurde als nächstes geprüft, inwieweit auch im neutralen Medium eine Übereinstimmung der spektralen Eigenschaften zwischen E-konfiguriertem PC-Chromopeptid und dem  $P_{fr}'$ -Chromopeptid bestehen.

In Abb. 8 sind auch die Absorptionsspektren von ZZZ- und ZZE-OEBV in reinem Chloroform mit abgebildet. Unter Berücksichtigung der Absorptionsunterschiede der Gallenfarbstoffe bei saurem und neutralem pH (Rüdiger, 1971 und 1980) zeigen sie unter diesen Bedingungen gleiches photochemisches Verhalten und vergleichbare spektrale Unterschiede wie im protonenhaltigen Medium. Bemerkenswert ist allerdings die Tatsache, daß die freie Base und das Kation des ZZE-Chromophors gleiche Absorptionsmaxima besitzen (neben der typischen, um den Faktor von rund 2 verringerten Absorption der freien Base gegenüber dem Kation), obwohl bei den ZZZ-konfigurierten Gallenfarbstoffen das Chromophorkation "normalerweise" deutlich längerwelliger absorbiert als die freie Base (vergleiche die Elektronenspektren des ZZZ-OEBV in saurem und neutralen Chloroform in Abb. 8).

In Abb. 9 ist das Elektronenspektrum des E-konfigurierten PC-Chromopeptides in neutraler, wässriger Lösung mit abgebildet. Gegenüber dem entsprechenden Chromophorkation zeigt es die gleichen spektralen Eigenschaften wie die freie Base des E-OEBV gegenüber dem E-konfigurierten Chromophorkation (siehe oben). Im Gegensatz zum E-OEBV kann im E-konfigurierten PC-Chromopeptid in neutraler Lösung durch Belichtung keine Änderung im Absorptionsspektrum induziert werden, wie dies auch für denaturiertes  $P_{fr}$  in neutraler Lösung beschrieben wurde (Grombein et al., 1975). Nach Grombein et al. hat dies seine Ursache darin, daß der  $P_{fr}'$ -Chromophor bei neutralem pH instabil ist und spontan zum  $P_r'$ -Chromophor revertiert, der gegenüber Belichtung stabil ist. Daß jedoch das E-PC-Chromopeptid in neutraler Lösung nicht spontan in die Z-Form revertiert, sondern im Gegenteil bei neutralem pH in Analogie zu den Modellchromophoren eine höhere Stabilität als bei saurem pH besitzt, zeigt folgender Versuch: Eine wässrige Lösung von E-PC-Chromopeptid ändert bei neutralem pH auch nach intensiver Belichtung (5 min Weißlicht) ihr Absorptionsspektrum kaum. Nach anschließendem Ansäuern

der Probelösung besitzt diese ein Absorptionsspektrum, das intermediär zwischen dem vom E- und Z-Chromopeptid bei saurem pH liegt (ohne Abbildung). Nach kurzer Weißlichtbestrahlung erhält man dann das bekannte Elektronenspektrum des ZZZ-PC-Chromopeptides bei saurem pH (Abb. 9). Ein ähnlicher Versuch mit dem  $P_{fr}'$ -Chromopeptid und mit denaturiertem Phytochrom ( $P_{fr}$ ) ergab ein analoges Ergebnis. Demnach ist der  $P_{fr}'$ -Chromophor auch im neutralen Medium stabil, jedoch bestehen bei neutralem pH zwischen dem  $P_{fr}'$ - und  $P_f'$ -Chromophor, bzw. zwischen dem E- und Z-konfigurierten PC-Chromopeptid, kaum spektrale Unterschiede. Wahrscheinlich hat diese Erscheinung ihre Ursache in einer stärker verdrehten Konformation der Chromopeptidchromophore im Vergleich zu den freien Modellchromophoren, da Falk und Thirring (1980) zeigen konnten, daß Modellchromophore mit künstlich verzerrter Chromophorkonformation analoge spektrale Eigenschaften besitzen. Die gute Übereinstimmung der spektralen und photochemischen Eigenschaften des  $P_{fr}'$ - mit denen des E-PC-Chromopeptides, ebenso deren übereinstimmendes Verhalten bei der P-10- und Kieselgelchromatographie ( $P_{fr}'$ - und E-PC-Chromopeptid, ebenso die E-konfigurierten Modellchromophore besitzen gegenüber ihren korrespondierenden stabilen Formen eine höhere Polarität) deuten sehr stark darauf hin, daß sich das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid wie ein E-Isomer des all-Z- $P_r'$ -Chromopeptides verhält.

#### 4. CD- bzw. LICD-Messungen an den Phytochromchromopeptiden und E-Z-Isomeren Modellchromophoren und Phycocyanin-chromopeptiden

Circulardichroismus (CD) bzw. lösungsmittelinduzierter-Circulardichroismus (LICD) wurden vielfach zur Konformationsanalyse der gebundenen Biliproteinchromophore und freier Gallenfarbstoffe eingesetzt (z.B. bei intaktem und degradier-

tem Phytochrom: Brandlmeier et al., 1981b; bei nativem und degradiertem PC: Lehner et al., 1983). In Lösung liegen die Gallenfarbstoffe in zyclischer Konformation vor, wobei sich die beiden Carbonylsauerstoffe an C-1 und C-19 wegen sterischer Hinderung gegenseitig aus einer Ebene drängen. Die daraus resultierende Helix hat eine Ganghöhe (C-O-Abstand) von rund 0.2 nm (Falk und Thirring, 1981) und wurde durch Röntgenstrukturanalyse (Sheldrick, 1976; Lehner et al., 1978a) und  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen bewiesen (Lehner et al., 1978b; Falk et al., 1978c). Prinzipiell können die Gallenfarbstoffhelices linksgängigen oder rechtsgängigen Schraubensinn besitzen. In achiralen Bilindionen, wie z.B. dem Biliverdin (3), stehen die beiden enantiomeren Konformationen im Gleichgewicht und sind durch einer Energiebarriere von etwa  $H^* = 42 \text{ KJ/mol}$  getrennt (Lehner et al., 1979). Wegen der racemischen Mischung der beiden Helices zeigen die achiralen Bilindione in achiralen Lösungsmitteln keinen Circular dichroismus. Die Gallenfarbstoff-Chromophore der natürlichen Biliproteine stellen wegen ihrer Bindung an eine Polypeptidkette stark asymmetrische Systeme dar, die auch im Molekül selbst Asymmetriezentren tragen. Aus diesem Grund ist bei ihnen eine der beiden Helices bevorzugt, wodurch sowohl die nativen als auch die denaturierten bzw. proteolytisch degradierten Biliproteine einen mehr oder weniger stark ausgeprägten Circular dichroismus zeigen (Brandlmeier et al., 1981 b). Durch Wechselwirkung mit chiralen Lösungsmitteln, wie z.B. L-(-)-Milchsäure, oder durch Absorption an eine chirale Matrix, wie z.B. Serum-Albumin (Wagnière und Blauer, 1976), kann auch in achiralen Gallenfarbstoffen eine enantiomere Helix bevorzugt werden und so ein induzierter Circular dichroismus (ICD) gemessen werden (z.B. Lehner et al., 1981). Zur Ausprägung eines ICD müssen aber einige Voraussetzungen erfüllt sein:

Die Konversionsenergie der beiden Helices darf nicht zu groß sein; so besitzt ein  $N_{21}$ - $N_{24}$  verbrückter Gallenfarbstoff (4) einen vernachlässigbar kleinen LICD, da dessen Konversionsenergie mindestens 60 kJ/mol beträgt (Falk und Thirring, 1981). Andererseits darf die Konversionsenergie nicht zu klein sein, da sonst keine der beiden Helices stabilisiert werden kann bzw. das Molekül eine planare Konformation einnimmt. Solche Strukturen, wie z.B. die Purpurinderivate des DHOEBV (7), besitzen dann keinen CD bzw. LICD mehr (Lehner et al., 1981). Aus diesem Grund zeigen auch die ZZE-Modellchromophore in L-(-)-Ethyllactat keinen nennenswerten LICD, wogegen die korrespondierenden ZZZ-Formen einen deutlichen LICD besitzen (Gossauer et al., 1981; Blacha-Puller, 1979).

Da aufgrund der spektralen und chromatographischen Eigenschaften für den  $P_{fr}'$ -Chromophor ebenfalls eine ZZE-Konfiguration sehr wahrscheinlich ist, der  $P_{fr}'$ -Chromophor in 8M Harnstoff aber einen deutlichen Circular dichroismus zeigt (Brandlmeier et al., 1981b), bestand hier ein Widerspruch zu den E-konfigurierten Modellchromophoren. Um diesen Widerspruch näher zu prüfen, wurden CD-Messungen am  $P_{fr}'$ - und  $P_r'$ -Chromopeptid und an E- und Z-isomeren PC-Chromopeptiden durchgeführt, und ebenso LICD-Messungen an E- und Z-isomeren OEBV.

#### 4.1. CD- bzw. LICD-Spektren der Phytochrom-Chromopeptide, E- und Z-konfigurierte Modellchromophore und Phycocyanin-Chromopeptide

Abb. 11 zeigt das CD-Spektrum vom  $P_{fr}'$ -Chromopeptid. Wegen Dunkelreversion vom  $P_{fr}'$ - zum  $P_r'$ -Chromopeptid enthielt die Probe auch einen Anteil an  $P_r'$ -Chromopeptid (rund 50%). Somit setzt sich das Spektrum aus den Anteilen der beiden Chromopeptidspezies zusammen. Bei Belichtung revertiert das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid vollständig zum  $P_r'$ -Chromopeptid. Im CD-Spektrum äußert sich dies in einer Verschmälerung der breiten positiven

Bande, speziell im Bereich der kurzwelligen Flanke. Damit ist aber kaum eine Änderung in der Elliptizität und nur eine geringe Verschiebung des Bandenmaximums verbunden. Besonders auffällig beim  $P_{fr}' \rightarrow P_r'$ -Übergang ist das Verschwinden des kleinen positiven Peaks bei 440 nm, der demnach allein vom Anteil des  $P_{fr}'$ -Chromopeptids resultiert. In diesem Bereich besitzt das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid aber minimale Absorption (siehe Abb. 6)

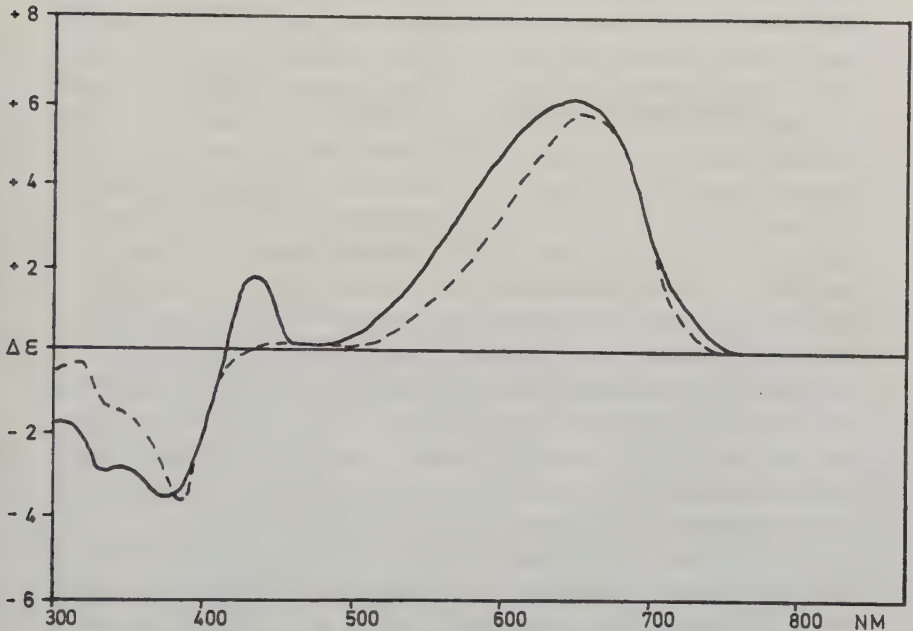


Abb. 11: CD-Spektrum von  $P_{fr}'$ -Chromopeptid in 50proz. wässriger Ameisensäure (—) und nach 10 s Weißlichtbestrahlung (----) =  $P_r'$ -Chromopeptid.

Die Transformation des  $P_{fr}'$ - zum  $P_r'$ -Chromopeptid ist auch mit einer kleinen Änderung in der Elliptizität in der nahen UV-Bande verbunden. Das durch die Belichtung der Probe erhaltene CD-Spektrum des  $P_r'$ -Chromopeptides stimmt mit dem von Brandlmeier et al. (1981b) an einer entsprechenden Probe gemessenem Spektrum bis auf eine Feinstruktur in der nahen UV-Bande genau überein. Im wesentlichen stimmt auch das CD-Spektrum des  $P_{fr}'$ -Chromopeptides, unter Berücksichtigung der Restanteile an  $P_r'$ -Chromopeptid, mit dem von Brandlmeier et al. (1981b) gemessenen CD-Spektrum von harnstoffdenaturiertem  $P_{fr}$  gut überein. Lediglich der Peak bei 440 nm fehlt im harnstoffdenaturiertem  $P_{fr}$  (allerdings ist er im ameisensäuredenatureirtem  $P_{fr}$  noch stärker ausgeprägt; dieses CD-Spektrum ist in Kap. II.7.3.2. abgebildet und diskutiert). Die Unterschiede zwischen den CD-Spektren der Phytochrom-Chromopeptide sind nicht gravierend. Die Banden besitzen jeweils das gleiche Vorzeichen, lediglich die Absorptionsunterschiede zwischen dem  $P_{fr}'$ - und dem  $P_r'$ -Chromophor kommen durch analoge Verschiebungen in den CD-Spektren zum Ausdruck. Demnach sollten zwischen dem  $P_{fr}'$ - und dem  $P_r'$ -Chromopeptid auch keine gravierenden Konformationsunterschiede bestehen. Lediglich die zusätzliche Bande bei 440 nm beim  $P_{fr}'$ -Chromopeptid weist auf eine besondere Wechselwirkung des Chromophors eventuell mit der kovalent gebundenen Peptidkette hin (siehe Kap. II.5.2.3. und 7.3.2.). Die DC-Spektren der beiden Phytochrom-Chromopeptide wurden nun mit denen von E- und Z-konfiguriertem PC-Chromopeptid verglichen. Um gleichzeitig auch den Einfluß der Peptidkette auf die CD-Spektren der Chromopeptide zu studieren, wurden bei diesen Versuchen einzelne Chromopeptidfraktionen (siehe Kap. II.3.1.2.) untersucht. Es zeigte sich, daß die Peptidketten auf den Verlauf der CD-Spektren keinen Einfluß haben, die Vorzeichen der entsprechenden CD-Banden in den einzelnen Chromopeptidfraktionen allerdings unterschiedlich waren. Selbst innerhalb einer Fraktion konnten diese bei verschiedenen Meßbedingungen unterschiedlich sein. So besaß die ZZZ-konfigurier-

te Fraktion 5 (IEP und Aminosäurezusammensetzung sind in Tab. 4 angegeben) vor einem Isomerisierungsversuch (siehe Kap. II.3.1.2.) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,7 eine positive rote und eine negative blaue Bande (Abb. 12). Nach der Isomerisierungsreaktion hatten dagegen die entsprechenden Banden im CD-Spektrum der Probe, die nach dem Entfernen des Merkaptoethanols noch die ZZZ-Konfiguration besaß, entgegengesetzte Vorzeichen (gemessen in 50% wässriger Ameisensäure; Abb. 12). Der ZZE-konfigurierte Chromopeptidanteil besaß da-

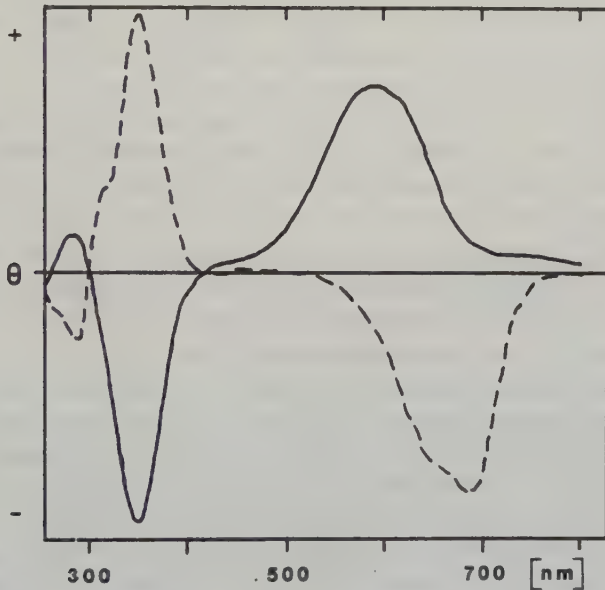


Abb. 12: CD-Spektrum von Z-PC-Chromopeptid (Fraktion 5; siehe Tab. 4) in 0,1M Kaliumphosphatpuffer pH 7,7 (—); selbe Probe nach Photoisomerisierung, Z-konfigurierter Anteil (siehe Kap. II.3.1.2.), in 50proz. wässriger Ameisensäure (---).

gegen in 50% wässriger Ameisensäure ein CD-Spektrum mit gleichen Vorzeichen wie das der Ausgangsprobe in neutralem Phosphatpuffer. Im Gegensatz zum  $P_{fr}'$ -Chromopeptid trat dann auch bei der Rückbelichtung gleichzeitig mit der bathochromen Verschiebung in der roten Bande ein Vorzeichenwechsel im CD-Spektrum auf. Dieser Versuch ist in Abb. 13 wiedergegeben. Die CD-Spektren der rückbelichteten Probe (Abb. 13) und nicht photoisomerisierten Probe (Abb. 12.), aufgenommen in 50% wässriger Ameisensäure, unterscheiden sich etwas. Im Falle der rückisomerisierten Probe hat es im roten Spektralbereich einen S-förmigen Verlauf. Die, bei dem Isomerisierungsversuch nicht photokonvertierte Probe besitzt in diesem Spektralbereich dagegen eine relativ breite Bande. Dies könnte darauf hindeuten, daß bei der Rückisomerisierung ein Gemisch aus ZZZ-konfigurierten Chromopeptiden mit nicht einheitlicher Konformation entsteht. Das CD-Spektrum des E-konfigurierten PC-Chromopeptides stimmt bis auf die Bande bei 440 nm mit dem des  $P_{fr}'$ -Chromopeptides (Abb. 11) gut überein. Damit konnte gezeigt werden, daß, im Gegensatz zu den E-konfigurierten Modellchromophoren, ein ZZE-konfigurierter Chromopeptid-Gallenfarbstoffchromophor einen vergleichbaren CD besitzt wie das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid oder harnstoffdenaturiertes  $P_{fr}$ .

Die Messung am E-konfigurierten Chromopeptid wurde in saurem, wässrigem Medium durchgeführt. Die LICD-Messungen an den Modellchromophoren wurden bisher aber nur in neutralen Lösungsmitteln durchgeführt. Daher schien es lohnenswert, das Verhalten der E-isomeren Modellchromophore auch im protonierten Lösungsmittel zu prüfen. So wurden LICD-Messungen an ZZE-OEBV (14) in neutralem und angesäuertem L-(-)-Ethyl-lactat durchgeführt. In Abb. 14 sind die entsprechenden LICD-Spektren wiedergegeben. Im neutralen Lösungsmittel konnten die deutlichen  $\Delta\epsilon$  Werte für ZZZ-OEBV bestätigt werden (ohne Abbildung; siehe Tab. 6; Lehner et al., 1981),

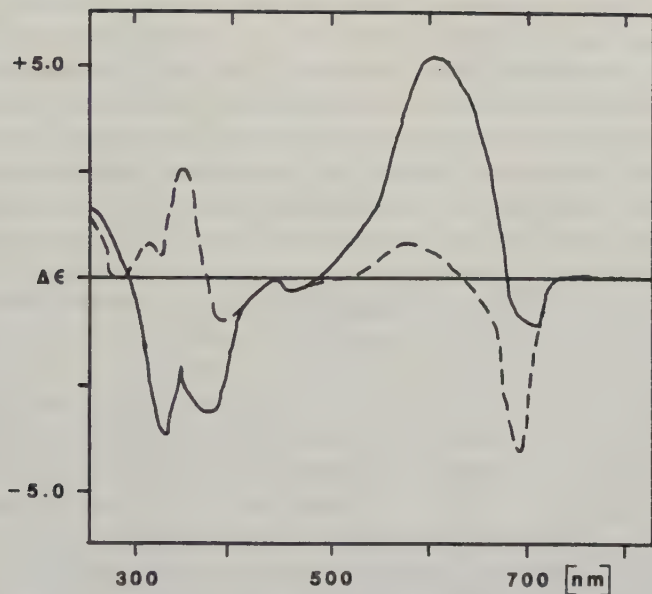


Abb. 13.: CD-Spektrum von E-konfiguriertem PC-Chromopeptid (Fraktion 5; siehe Tab. 4) in 50proz. wässriger Ameisensäure (—) und nach 10 s Weißlichtbestrahlung (-----) = Z-PC-Chromopeptid.

ebenso das Fehlen eines nennenswerten LICD für die E-Komponente (Blacha-Puller, 1979). Wie Abb. 14 zeigt, besitzt sie nur im nahen UV ein schwaches LICD-Signal. Nach Ansäuern besitzt auch ZZE-OEBV einen ausgeprägten LICD (Abb. 14). Dessen  $\Delta\epsilon$  Werte sind in der Größenordnung wie die für die

ZZZ-Komponente, die nach Belichtung der Probe gemessen werden können (Abb. 14). Die Phototransformation führt nicht nur zu einer, korrespondierend zur Absorption (Abb. 8), bathochromen Verschiebung der CD-Bande im roten Spektralbereich, sondern führt auch, wie im Beispiel des ZZE-PC-Chromopeptides, zu einer Inversion der Vorzeichen im LICD-Spektrum. Allerdings verschwindet die negative Bande nicht vollständig. Daß die negative "Restbande" mit dem ZZZ-Chromophor korrespondiert, und nicht etwa von einem Restanteil an E-isomeren Chromophor

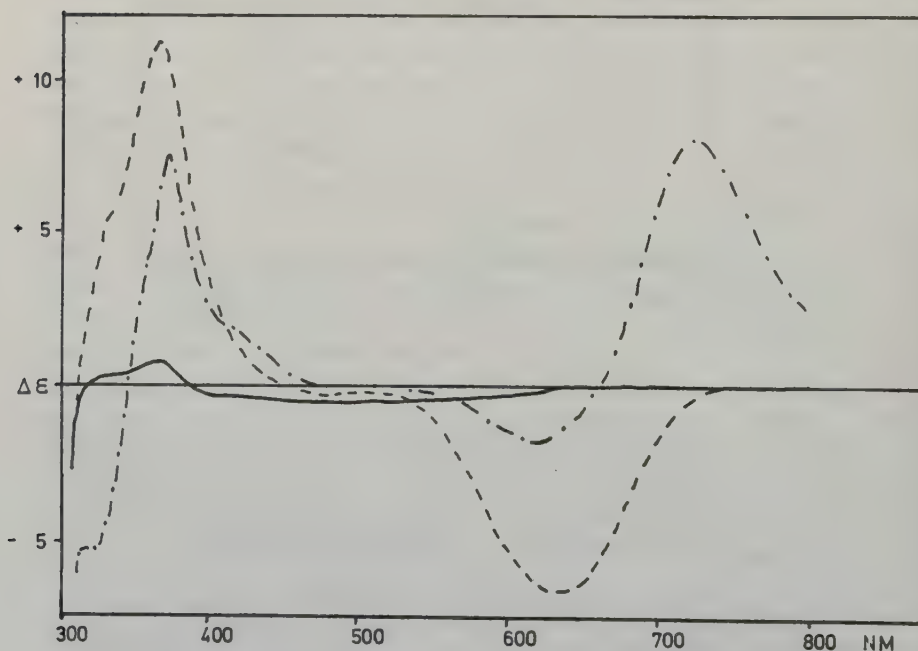


Abb. 14: LICD-Spektrum von E-OEBV in L-(-)-Ethyllactat  
(—), nach Ansäuern mit TFA (Endkonzentration =  
2%, v:v) (----) und nach 10 s Weißlichtbestrahlung  
(-.-.-) = Z-OEBV

resultiert, zeigt das Absorptionsspektrum der Probe nach der Photoumwandlung, das genau dem der Abb. 8 entspricht. Auffällig bei der Photoumwandlung ist das Aufspalten der positiven LICD-Bande im nahen UV des ZZE-OEBV zu einem positiven und negativen Anteil bei ZZZ-OEBV (Abb. 14). Damit besteht auch im LICD der E-Modellchromophore eine gute Übereinstimmung mit dem CD der E-PC-Chromopeptide, und mit Einschränkungen auch mit dem der  $P_{fr}'$ -Chromopeptide. Die CD- bzw. LICD-Daten der einzelnen Komponenten sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Offenbar führt, den obigen Ausführungen zufolge, die Protonierung der vorher planaren E-konfigurierten Chromophore zu einer stärker helicalen Anordnung, da die E-konfigurierten Chromophorkationen einen ausgeprägten LICD besitzen. Denkbar wäre, daß eine sterische Hinderung des zusätzlichen Protons am  $N_{23}$  des Pyrrolrings C mit dem benachbarten H des  $N_{22}$  zu einer leichten Verdrillung um die C-10-Methinbrücke führt, und es damit zu einer offeneren Konformation des Chromophors kommt.

Nach neuesten Erkenntnissen (pers. Mitteilung Prof. Schneider) muß aber auch der Einfluß der positiven Ladung des Protons auf das  $\pi$ -Elektronensystem mit berücksichtigt werden (die Chromophore (4) und (5) können wegen intramolekularer Brücken keine großen Konformationsänderungen durchführen, trotzdem zeigen sie die charakteristischen Spektralverschiebungen bei der Protonierung siehe Abb. 4a und b).

Tabelle 6: CD-Daten von Phytochrom- und Phycocyaninchromopeptiden und LICD-Daten von Oktaethylbiliverdin (Temperatur = 10° C)

| No. | Probe,<br>Lösungsmittel                               | $\lambda_{max}$ (nm)<br>Absorption | CD (nm) | $\Delta \epsilon_{max}$<br>( $M^{-1} cm^{-1}$ ) |
|-----|-------------------------------------------------------|------------------------------------|---------|-------------------------------------------------|
| 1.  | $P_{fr}'$ -Chromopeptid,<br>50% wässrige Ameisensäure | 675(s)                             |         |                                                 |
|     |                                                       | 620                                | 650     | + 6,1                                           |
|     |                                                       |                                    | 438     | + 1,6                                           |
|     |                                                       | 375(s)                             | 375     | - 4,1                                           |
|     |                                                       | 335                                | 333     | - 3,2                                           |

| No. | Probe,<br>Lösungsmittel                                                                    | $\lambda_{\text{max}}$ (nm)<br>Absorption | CD (nm)                            | $\Delta \epsilon_{\text{max}}$<br>(M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ) |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 2.  | No. 1 nach Belichtung<br>(P <sub>1</sub> -Chromopeptid),<br>50% wässrige Ameisen-<br>säure | 660<br>375(s)<br>335                      | 663<br>383<br>333(s)               | + 5,7<br>- 3,6<br>- 1,4                                               |
| 3.  | PC-Chromopeptid (F5)<br>E-konfiguriert,<br>50% wässrige Ameisen-<br>säure                  | 700(s)<br>585<br>355<br>325               | 700<br>609<br>366<br>333           | - 0,8<br>+ 5,0<br>- 3,1<br>- 3,4                                      |
| 4.  | No. 3 nach Belichtung,<br>Z-konfiguriert,<br>50% wässrige Ameisen-<br>säure                | 640<br><br>355<br>325(s)                  | 687<br>566<br>388<br>340<br>305    | - 4,8<br>+ 0,3<br>- 0,3<br>+ 0,8<br>+ 0,3                             |
| 5.  | PC-Chromopeptid (F5),<br>0,1M Kaliumphosphat-<br>puffer pH 7,7                             | 590<br>350                                | 555<br>338<br>275                  | +40,8<br>-54,2<br>+ 5,1                                               |
| 6.  | PC-Chromopeptid (F5),<br>50% wässrige Ameisen-<br>säure                                    | 640<br>355                                | 685<br>650(s)<br>350<br>287        | - 6,3<br>- 5,3<br>+ 7,1<br>- 1,9                                      |
| 7.  | PC-Chromopeptid (F2),<br>2% wässriges Pyridin<br>pH 7,3                                    | 600<br>405<br>350                         | 660<br>577<br>403<br>350           | + 1,8<br>- 1,5<br>- 0,8<br>+ 9,8                                      |
| 8.  | No. 7 plus TFA (End-<br>konz. 0,4M; pH 1,3)                                                | 645<br>350<br>330                         | 685<br>410<br>342<br>313(s)        | - 8,2<br>- 0,6<br>+ 9,0<br>+ 5,0                                      |
| 9.  | OEBV E-konfiguriert,<br>L-(-)-Ethyllactat                                                  | 610<br>369                                | 368<br>335(s)                      | + 1,1<br>+ 0,6                                                        |
| 10. | No. 9 nach Belichtung,<br>Z-konfiguriert,<br>L-(-)-Ethyllactat                             | 670<br>630<br>369                         | 683<br><br>369                     | - 3,4<br><br>+ 6,5                                                    |
| 11. | No. 9 plus TFA (End-<br>konz. 2%, v:v; E-<br>konfiguriert)                                 | 610<br>365<br>324                         | 635<br>365<br>330                  | - 6,5<br>-11,6<br>- 5,9                                               |
| 12. | No. 11 nach Belichtung,<br>Z-konfiguriert,<br>L-(-)-Ethyllactat plus<br>2% TFA (v:v)       | 705<br>660<br>360                         | 725<br>620<br>425(s)<br>370<br>320 | - 8,2<br>- 1,8<br>+ 1,5<br>+ 7,6<br>- 5,5                             |

#### 4.2. pH-Abhängigkeit der CD- bzw. der LICD-Spektren der Gallenpigmente und Konformationsvielfalt der Gallenpigmente

Wie drastisch sich Protonierung der Gallenfarbstoffchromophore auf deren CD-Spektrum auswirkt, zeigt die Abb. 15. Sie gibt die CD-Spektren der Fraktion 2 der PC-Chromopeptidpräparation (IEP und Aminosäureanalyse ist in Tab. 4 angegeben) bei saurem und neutralen pH wieder. In neutraler Lösung hat Fraktion 2 ein deutliches CD-Signal im nahen UV, zwischen 500 und

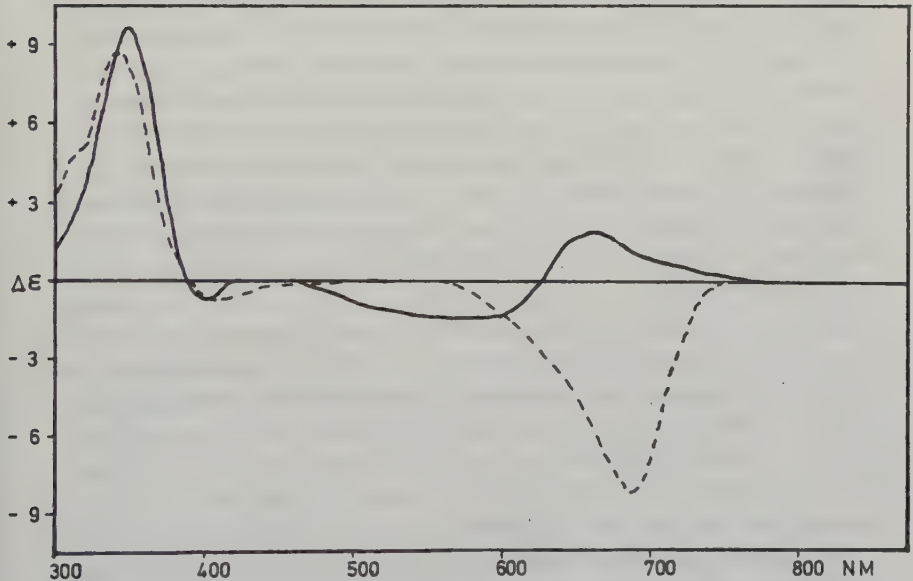


Abb. 15: CD-Spektrum von Z-PC-Chromopeptid (Fraktion 2; siehe Tab. 4) in 2proz. wässrigem Pyridin (—) und nach Ansäuern mit TFA (Endkonzentration = 4%, v:v) (-----)

800 nm hat das CD-Spektrum einen flachen, S-förmigen Verlauf mit geringen  $\Delta\epsilon$  Werten. Nach Ansäuern ergibt sich dagegen eine scharfe Bande bei 685 nm mit relativ großer Elliptizität, wogegen sich die kurzwellige Bande wenig ändert.

Die starke Lösungsmittelabhängigkeit der CD- und Absorptionsspektren der Gallenfarbstoffe ist ein Hinweis dafür, daß diese wegen ihrer großen Beweglichkeit um die Methinbrücken in Lösung in einer Vielzahl von Konformationen vorliegen können. Mit Hilfe von Fluoreszenz und LICD-Messungen konnten Braslavsky et al. (1980) zeigen, daß Biliverdin (2) in Lösung mindestens zwei unterschiedliche Konformationen einnimmt, nämlich eine geschlossene, zyklische Konformation mit bathochrom verschobener und einer offenen Konformation mit hypsochrom verschobener Absorption. Sie sollen durch Drehung der beiden Pyrromethenonhälften um die C-10-Methinbrücke entstehen (Braslavsky et al., 1983). In Analogie dazu besitzt ZZZ-OEBV (12) in saurer Lösung im sichtbaren Spektralbereich ein langwelliges Absorptionsmaximum mit einer deutlichen, kürzerwelligen Schulter (Abb. 18), und im LICD-Spektrum (Abb. 14) erscheinen an den entsprechenden Stellen ein negatives und ein positives Signal.

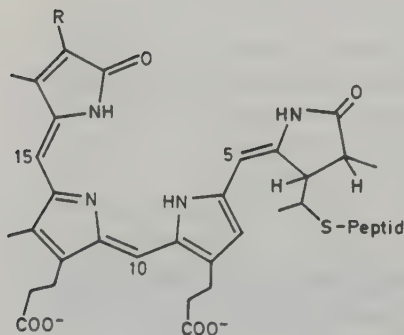
Es ist auffällig, daß bei den freien Gallenpigmenten, im Gegensatz zum intakten Phytochrom, in dem der Chromophor ja eine fixierte Konformation besitzt, die Maxima der Absorptions- und CD- bzw. LICD-Spektren nicht übereinstimmen (Tab. 6). Dieser Beobachtung könnte zugrunde liegen, daß in der Summe der möglichen Konformationen der freien Biline einige dabei sind, die relativ hohe  $\Delta\epsilon$ -Werte besitzen (Lehner et al., 1981). Dieser Erklärung liegt auch die Annahme zugrunde, daß unter der breiten, unstrukturierten Absorptionsbande der freien Gallenfarbstoffe im langwelligen Spektralbereich unterschiedlich konformierte Chromophore verborgen liegen, die selbst relativ scharfe Absorptionsbanden besitzen (Scheer, 1981). In Übereinstimmung damit besitzen Gallenfarbstoffe, die aus

den oben genannten Gründen keine stabilen Diastereomere ausbilden, wie die planaren Purpurine (z.B. (7)), schärfere Absorptionsbanden als die "normalen" Gallenpigmente, wie z.B. das Biliverdin (3) (Scheer et al., 1977). Dies könnte auch der Grund dafür sein, warum ZZE-OEBV und ZZE-PC-Chromopeptid gegenüber den entsprechenden ZZZ-Formen schärfere Absorptionsbanden im sichtbaren Spektralbereich besitzen (Abb. 8 und 9) und daß das LICD-Spektrum von ZZE-OEBV weniger strukturiert ist als das von ZZZ-OEBV (Abb. 14). Abbildung 6 zeigt, daß auch das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid eine schärfere langwellige Absorptionsbande als das  $P_r'$ -Chromopeptid besitzt und sollte demnach eine einheitlichere Konformation als das  $P_r'$ -Chromopeptid besitzen. Die durch experimentelle Befunde gestützte Annahme, daß die Gallenfarbstoffe in freier Lösung eine Vielzahl verschiedener Konformationen einnehmen, erhielt erst kürzlich eine theoretische Bestätigung. Mit Hilfe von "force field"-Berechnungen ermittelten Falk und Müller (1983) nur geringe Energiebarrieren zwischen einer Vielzahl diastereomerer Gallenfarbstoffe. Konformationen, die auf gleichem Energieniveau liegen, können nach diesen Berechnungen durch Lösungsmittel oder andere äußere Parameter (wie z.B. unterschiedliche Peptidketten bei den Chromopeptiden) leicht stabilisiert werden, und der Einfluß der Konformation auf die Absorptionsspektren wird besonders in den Abbildungen 4a und b deutlich.

5. Strukturaufklärung des Chromophores des  $P_{fr}'$ -Chromopeptides mit Hilfe von  $^1H$ -NMR-Spektroskopie

Der  $P_{fr}'$ -Chromophor zeigt in seinem chromatographischen, spektralen (UV-Vis und CD) und photochemischen Verhalten sehr gute Übereinstimmung mit den E-konfigurierten Gallenfarbstoffen. Doch sind diese Daten nicht ausreichend, um dem  $P_{fr}'$ -Chromophor

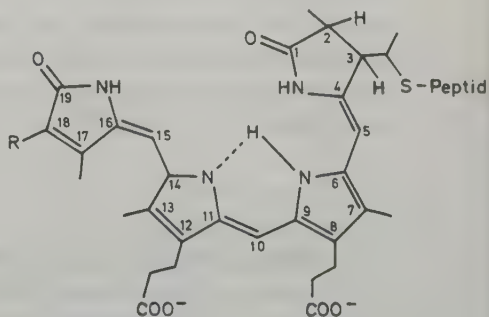
endgültig eine E-Konfiguration zuzuordnen und letztlich eine Z-E-Isomerisierung als zentrale Chromophorreaktion der Phytochrom-Photokonversion zu postulieren. Endgültige Antwort auf die Frage nach der Struktur des  $P_{fr}'$ -Chromophors war mit Hilfe der NMR-Spektroskopie zu erwarten. So stand als Schwerpunkt dieser Arbeit die  $^1H$ -NMR-Spektroskopie am  $P_{fr}'$ -Chromopeptid und an E-isomeren Vergleichssubstanzen im Vordergrund. Falk et al. (1978b) und Blacha-Puller (1979) konnten von völlig ungesättigten Bilindionen mit ähnlichem Konjugationssystem wie bei OEBV (12), aber mit asymmetrischen Substitutionsmuster an den  $\beta$ -Seitengruppen, stabile 4E, oder 15E und 4E, 15E Isomere isolieren. Bei den A-Dihydrosystemen, denen der Phytochrom- (1a) und PC-Chromophor (1b) oder das DHOEBV (6) angehören, konnten nur 15E-Isomere nachgewiesen werden, die E4-Isomere waren offensichtlich nicht stabil. Trotzdem sprachen die Spektraldaten des  $P_{fr}'$ -Chromophors für eine Entkoppelung an der C-5 Methinbrücke (Kap. II.1.2. und 2.2.). Somit war für den  $P_{fr}'$ -Chromophor sowohl das 4E (15a) als auch das 15E-Isomer (16a) des all-Z- $P_r'$ -Chromophors (1a) denkbar.



EZZ

(15a): R = CH=CH<sub>2</sub>

(15b): R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>



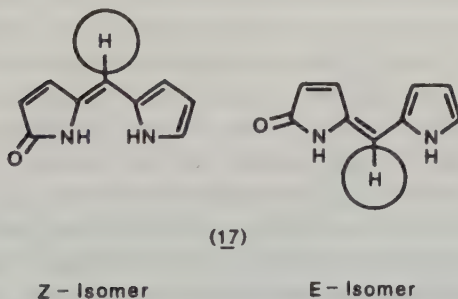
ZZE

(16a): R = CH=CH<sub>2</sub>

(16b): R = C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>

5.1. Wahl des geeigneten Lösungsmittels für die  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen an den Chromopeptiden von Phytochrom und Phycocyanin

Charakteristisch für das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum E-konfigurierter Bilindione ist die Verschiebung der Resonanz des Methinprotons (eingekreist in Formel (17)) der E-konfigurierten Doppelbindung zu niederem Feld, im Vergleich zum korrespondierenden Z-Isomer (Falk et al., 1978b; Falk et al., 1980; Blachapuller, 1979). Die Resonanzen der nicht direkt von der Isomerisierung betroffenen Methinprotonen erfahren dabei auch kleine, aber signifikante Verschiebungen (siehe unten). Die



chemischen Verschiebungen für die Resonanzen der Methinprotonen sind lösungsmittel- und pH-abhängig, jedoch bleiben die Differenzen aus den chemischen Verschiebungen der entsprechenden Methinprotonen der E- und Z-Isomeren davon unberührt

(siehe Tab. 7). Zur Lösung des Problems war es deshalb wichtig, alle Methinresonanzen der Probesubstanz zu erhalten. Unglücklicherweise wird aber in R-OD haltigen NMR-Lösungsmitteln bei den A-Dihydrobilindionen das, dem A-Dihydroring benachbarte 5-H Methinproton sehr leicht in einer  $H^+$  (oder  $D^+$ ) katalysierten Reaktion gegen Deuterium ausgetauscht (z.B. in  $D_2O$  (Lagarias und Rapoport, 1980),  $CD_3OD$  (Gossauer et al., 1981), oder in  $CF_3OOD$  (Krauss, 1980)). Dies führt zum Verschwinden der 5-H Resonanz im  $^1H$ -NMR-Spektrum und damit zu einem Verlust der gewünschten Information. Wegen der wesentlich höheren Reaktivität der A-Dihydrobilindione in neutraler Lösung (speziell die hohe Empfindlichkeit gegenüber zweiwertigen Metallionen; Krauss, 1980) und der relativ hohen Stabilität der E-Chromophore in neutraler Lösung gegenüber Belichtung (siehe Kap. II.3.2.), war es günstiger, die Messungen in einem sauren Lösungsmittel auszuführen. Es mußte also ein Lösungsmittel gefunden werden, in dem die Löslichkeit der Chromopeptide, chemische Stabilität der Chromophore und quantitative Photo-transformation der E- in die Z-Isomere gegeben war, gleichzeitig aber kein Deuteriumaustausch an C-5 stattfinden durfte. Während des letzten Reinigungsschritts ist das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid (bzw. das E-PC-Chromopeptid) an Kieselgel adsorbiert (siehe Kap. II.2.1. und 3.1.2.). Elution des Chromopeptids in einer scharfen Zone vom Kieselgel war eine Möglichkeit, die Probe in ein NMR-taugliches Lösungsmittel ohne Gefriertrocknung (sie führt zur partiellen Reversion des  $P_{fr}'$ - zum  $P_r'$ -Chromopeptid; siehe Kap. II.2.1.) zu überführen. Deshalb mußte ein Lösungsmittel gefunden werden, das auch eine gute Desorption des  $P_{fr}'$ -Chromopeptides von der Kieselgelmatrix ermöglichte. All diese Anforderungen erfüllte folgendes Lösungsmittelsystem hinreichend: Deuteroaceton/ $H_2O$ / $CF_3OOH$  (85:10:5 im Falle des  $P_{fr}'$ -Chromopeptids und 80:10:10, v:v:v, im Falle des E-PC-Chromopeptids, da dieses fester an das Kieselgel bindet).

Zuerst wurde die Kieselgelsäule mit der gebundenen Probe mit Deuteroaceton gewaschen, um alles protonierte Lösungsmittel zu entfernen. Diese Behandlung führte nicht zur Elution der Chromopeptide. Diese erfolgte dann anschließend mit dem beschriebenen Lösungsmittelsystem. Es ermöglichte  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen mit gut interpretierbaren Resonanzen, auch bei niedriger Temperatur (die Normaltemperatur im Probekopf des NMR-Meßgerätes beträgt rund  $40^\circ\text{C}$ ). Dies war wegen der temperaturabhängigen Reversion des  $\text{P}_{\text{fr}}'$ -Chromopeptides und der E-isomeren Chromophore wünschenswert. Bei  $10^\circ\text{C}$  war die Stabilität des  $\text{P}_{\text{fr}}'$ -Chromophors und der E-isomeren Chromophore zufriedenstellend, und die Methinsignale wurden nicht von dem temperaturabhängigen  $\text{H}_2\text{O}$ -Signal gestört. Die Lage des  $\text{H}_2\text{O}$ -Signals war auch von der relativen Konzentration an  $\text{H}_2\text{O}$  und TFA abhängig. Bei hohen TFA-Konzentrationen wurde es zu niedrigerem Feld verschoben und interferierte mit den Methinresonanzen. Andererseits mußte die TFA-Konzentration groß genug sein, um eine gute Elution der Chromopeptide zu ermöglichen. Das angegebene Mischungsverhältnis der einzelnen Komponenten stellte einen optimalen Kompromiss zwischen den gegensätzlichen Anforderungen an das Lösungsmittel dar. Die chemische Verschiebung des  $\text{H}_2\text{O}$ -Signals des Lösungsmittelsystems in Abhängigkeit von der Temperatur ist in Abb. 16 wiedergegeben. Wegen der nicht deuterierten Komponenten des Lösungsmittelsystems (aus Gründen der optimalen Justierung der NMR-Gerätes ist eine hohe Deuteriumkonzentration in der Meßprobe nötig) bleibt das 5-H trotz säurekatalysiertem Protonenaustausch in seiner protonierten Form. Der Protonenaustausch führt nicht zu Verbreiterung der 5-H Resonanz, da er im Vergleich zur Zeitskala des NMR-Experimentes langsam abläuft. Wegen der hohen Protonenkonzentration waren die Lösungsmittelsignale ( $\text{H}_2\text{O}$  und Aceton) im Verhältnis zu den Probesignalen sehr groß. Zur Verkleinerung dieses Verhältnisses wurden die Lösungsmittelprotonen kurz vor dem Meßpuls mit einem sättigenden Impuls angeregt (gated solvent decoupling).

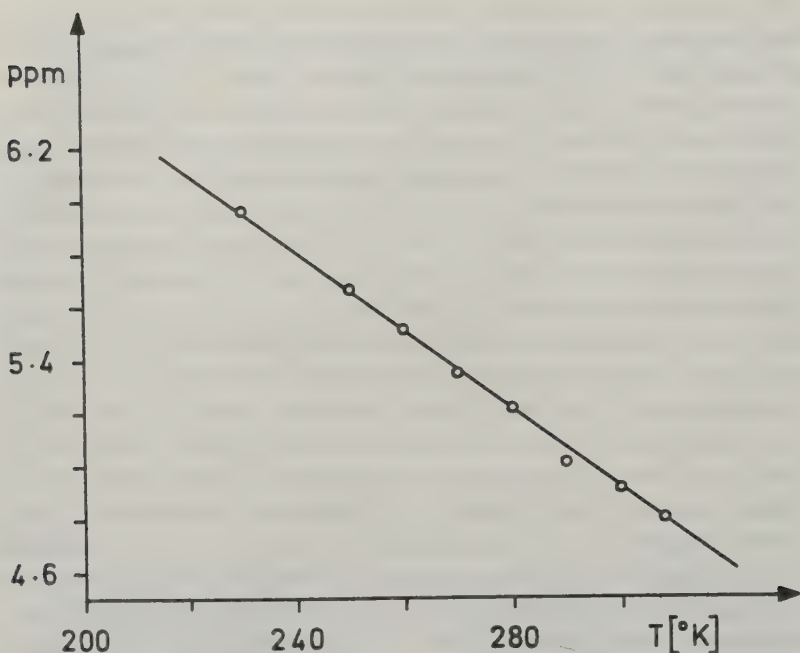


Abb. 16: Abhängigkeit der chemischen Verschiebung der  $\text{H}_2\text{O}$ -Resonanz des Lösungsmittelsystems Aceton- $\text{d}_6/\text{H}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COOH}$  (85:10:5, v:v:v) in Abhängigkeit von der Temperatur. Die chemische Verschiebung ist angegeben in parts per million vom Aceton- $\text{d}_6$  (2,05 ppm)

## 5.2. $^1\text{H}$ -NMR-Messungen an peptischen Chromopeptiden von Phycocyanin und Phytochrom

Zuerst wurden die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren vom  $\text{P}_{\text{fr}}'$ -Chromopeptid bzw. einer Präparation von E-konfiguriertem PC-Chromopeptid (Fraktion 8; IEP siehe Tab. 4) aufgenommen. Da diese Substanzen

lichtempfindlich sind, wurden die Messungen im dunklen bzw. grünen Sicherheitslicht (exp. Teil, Seite 137) durchgeführt. Um zu starke Dunkelreversion der Proben zu verhindern, wurden die Spektren bei 10° C aufgenommen. Anschließend wurden die Proben in den NMR-Röhrchen belichtet, um sie in die Form (1a) bzw. (1b) zu überführen. Direkt danach wurden auch deren <sup>1</sup>H-NMR-Spektren aufgenommen. Um einen besseren Vergleich zu ermöglichen, wurden die Spektren wie folgt angeordnet: Abbildung 17 zeigt den  $\delta$ -Bereich von 9,05 bis 0,70 ppm. Das Spektrum des nicht belichteten P<sub>fr</sub>'-Chromozeptides wird als A und das des belichteten als A' bezeichnet, B und B' bezeichnen die Spektren der entsprechenden PC-Chromozeptide. Der  $\delta$ -Bereich um die Lösungsmittelresonanzen (H<sub>2</sub>O, 5,33 ppm; Aceton 2,050 ppm) ist ausgelassen. Die <sup>1</sup>H-NMR-Resonanzfrequenzen der Chromophorprotonen können in Tabelle 8 gefunden werden, die Resonanzen der Peptidkette sind in Tabelle 10 aufgelistet.

#### 5.2.1. Die Chromophorresonanzen der E- und Z-konfigurierten Phycocyanin-Chromozeptide

Die Signalzuordnung erfolgte auf der Basis der chemischen Verschiebungen und charakteristischen Multiplizität der Chromophorresonanzen im Vergleich mit Messungen an geeigneten Modellchromophoren und früheren Messungen an PC-Chromozeptiden (Lagarias et al., 1979). Insbesondere wurden die Unterschiede in den <sup>1</sup>H-NMR-Spektren des E- und Z-konfigurierten PC-Chromozeptides mit denen von E- und Z-konfigurierten Modellchromophoren verglichen.

Das erste Ziel war die Identifizierung der Resonanzen der Methinprotonen der E- und Z-konfigurierten PC-Chromozeptide. Da für den Z-konfigurierten, proteinunbeeinflussten Phytochrom (Lagarias und Rapoport, 1980) und Phycocyaninchromophor (Lagarias et al., 1979) die Lage der Chromophorresonanzen nur

Abb. 17

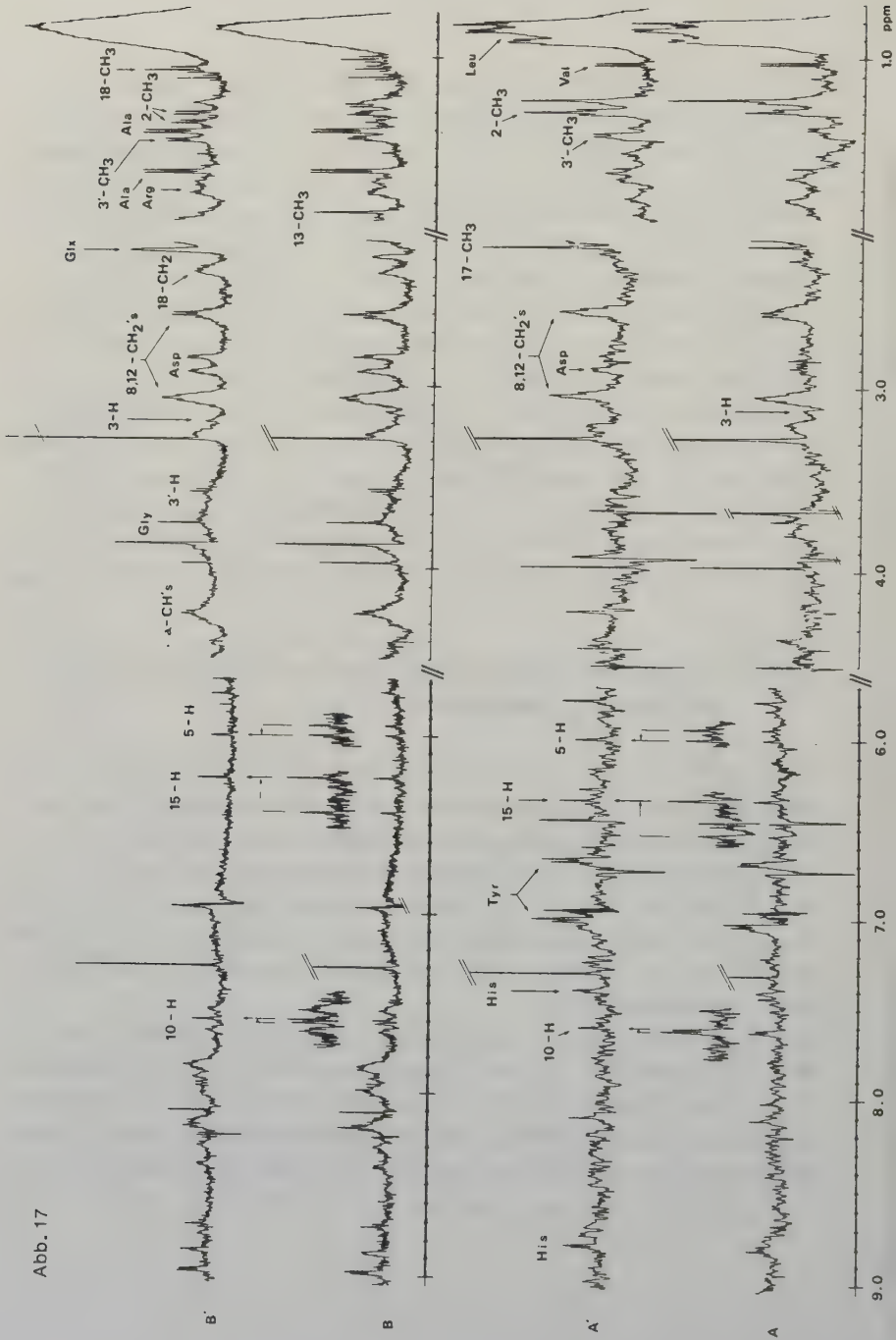


Abb. 17: 500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren vom Phytochrom- ( $c = 9,4 \times 10^{-5} \text{ M}$ ) und Phycocyanin-Chromopeptid ( $c = 1,3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ) in Aceton- $\text{d}_6/\text{H}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COOH}$  bei  $10^\circ \text{ C}$  im  $\delta$ -Bereich von 9,05 bis 5,70 ppm, 4,50 bis 2,20 ppm und 1,90 bis 0,70 ppm. A)  $\text{P}_{\text{fr}}'$ -Chromopeptid, das etwas  $\text{P}_{\text{r}}'$ -Chromopeptid enthält. A')  $\text{P}_{\text{r}}'$ -Chromopeptid, erhalten aus Probe A) durch Weißlichtbestrahlung. B) E-konfiguriertes PC-Chromopeptid, das etwas Z-PC-Chromopeptid enthält. B') Z-PC-Chromopeptid, erhalten aus B) durch Weißlichtbestrahlung.

---

in neutralem bzw. leicht basischem Lösungsmittel bekannt waren, mußte zuerst der Einfluß der TFA-Konzentration auf die Lage der Methinresonanzen bei A-Dihydrobilindionen geprüft werden. In Abbildung 18 ist der Einfluß der TFA-Konzentration auf die Lage der Methinresonanzen von ZZZ-DHOEBV (6) schematisch dargestellt. Die 5-H-Resonanz spaltet in ein Doublett auf ( $J = 1,2 \text{ Hz}$ ; Fernkopplung mit 3-H) und kann deshalb leicht identifiziert werden. Man sieht, daß die Zugabe von TFA zur Lösung von (6) in Aceton- $\text{d}_6$  zu einer deutlichen Verschiebung der Resonanz des 10-H zu niederem Feld bewirkt, während der gleichsinnige Einfluß auf die Resonanz des 5-H und 15-H geringer ist. Interessanterweise bleibt der Abstand der 5-H und 15-H-Resonanzen während dem Ansäuern nahezu konstant. Zugabe von Wasser zu der Lösung von (6) in reinem Aceton- $\text{d}_6$  führt zu keiner signifikanten Verschiebung der Methinresonanzen. Die säureinduzierte Verschiebung der 10-H-Resonanz zu niederem Feld ist auch beim Vergleich der Messung am PC-Chromopeptid im beschriebenen Lösungsmittelsystem mit einer entsprechenden Messung in  $\text{D}_2\text{O}$  (Lagarias et al., 1979) zu beobach-

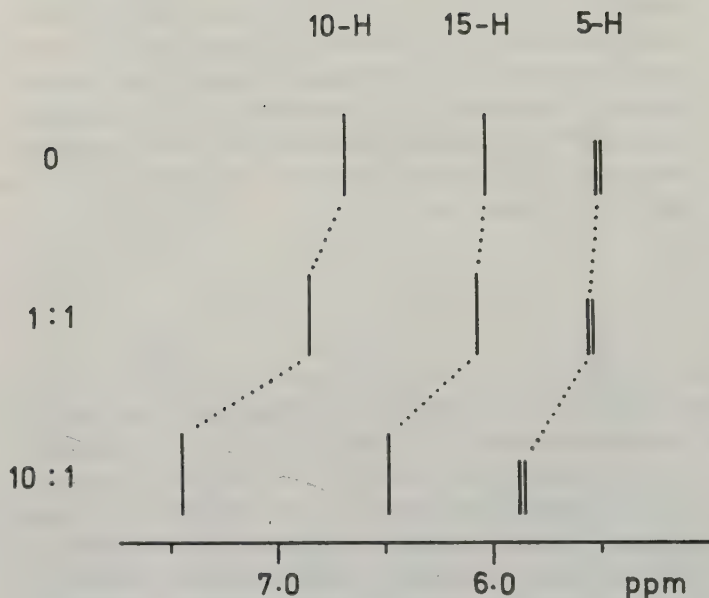
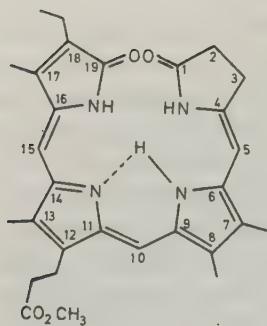


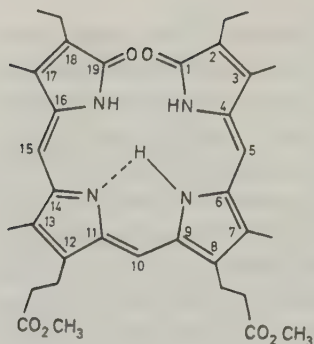
Abb. 18: Chemische Verschiebungen der Methinprotonen nach Zugabe von Äquivalenten von TFA im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum (80 MHz) von ZZZ-DHOEBV (6) in Aceton- $\text{d}_6$  (TFA-Zugabe im Verhältnis 0, 1:1 und 10:1 zur Menge an gelöstem (6)).

ten. Dagegen zeigen die Resonanzen des 5-H und des 15-H in beiden Lösungsmitteln fast identische chemische Verschiebungen (Tab. 8). Da die Präparation des E-konfigurierten PC-Chromopeptides wegen Dunkelreversion auch die Z-konfigurierte Komponente (1b) enthielt, enthält das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Abb. 17 B die Resonanzen beider Komponenten. Da aber nur die E-

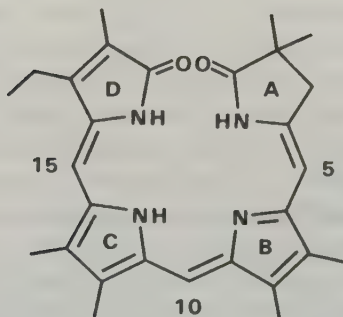
konfigurierte Chromophorspezies lichtempfindlich ist, verschwinden die E-spezifischen Resonanzen bei Belichtung, während die korrespondierenden Resonanzen der Z-Komponente zunehmen. Dies erleichtert die Zuordnung Z- und E-spezifischer NMR-Resonanzen. Dies ist insbesondere bei den Methinresonanzen der Fall (vergleiche Abb. 17 B und B'). Die chemischen Verschiebungen der Methinprotonen des E-konfigurierten PC-Chromopeptides zeigen, daß es das 15E-Isomer (16b) und nicht das 4E-Isomer (15b) darstellt. Dies zeigt der Vergleich der  $^1\text{H}$ -NMR-Daten des E-PC-Chromopeptids mit den  $^1\text{H}$ -NMR-Daten E-konfigurierter Modellchromophore. Sie sind in Tabelle 7 gegenübergestellt. Sie beinhaltet die  $\Delta\delta$ -Werte aus den chemischen Verschiebungen der einzelnen Methinresonanzen der E- minus der Z-Komponenten. Demnach ist für alle 15-E-Isomere im Vergleich zu den korrespondierenden Z-Komponenten eine Verschiebung der Resonanz des 15-H von 0,16 bis 0,27 ppm zu niederem Feld charakteristisch. Die  $\Delta\delta$ -Werte aus den chemischen Verschiebungen der anderen Methinresonanzen (5-H und 15-H), die nicht von der Isomerisierung betroffen sind, sind, wenn überhaupt, nur sehr gering. Im Falle des E-PC-Chromopeptides beträgt die  $\Delta\delta$ -Verschiebung der 15-H Resonanz 0,195 ppm zu niederem Feld. Falk et al. (1983) konnten kürzlich das 4E-Isomer eines A-Dihydrobindions (18) mit Hilfe von  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie charakterisieren. Im Gegensatz zur Isomerisierung an der C-15 Methinbrücke führt die Isomerisierung an der C-5 Methinbrücke zu einer starken Verschiebung der 5-H Resonanz zu niederem Feld, und die 10-H und 15-H Resonanzen erfahren dabei ebenfalls größere Verschiebungen (Tab. 7). Die relativen Verschiebungen der Methinresonanzen beim Übergang von den E- zu den Z-Komponenten scheinen (mehr oder weniger) unabhängig von den Lösungsmitteln und den  $\beta$ -Substituenten zu sein.



(19)



(20)



(18)

Die Zuordnung der restlichen Chromophorresonanzen im all-Z und 15E-Chromopeptid erfolgte in gleicher Weise wie bei den Methinprotonen. Sie sind in Tab. 8 aufgelistet. Die Daten des PC-Chromopeptides nach Belichtung (Bildung der ZZZ-Form) stimmen innerhalb  $\pm 0,1$  ppm mit den Daten von Lagarias et al. (1979) für die PC-Chromopeptidmessung in  $D_2O$  überein. Lediglich das

10-H besitzt in Aceton- $d_6$ /H<sub>2</sub>O/TFA im Vergleich zu D<sub>2</sub>O eine um 0,15 ppm zu niedrigem Feld verschobene Resonanz. Das Triplet bei 1,006 ppm kann den Methylprotonen der 18-Ethylgruppe von (16b) zugeordnet werden. Es verschwindet bei Belichtung, während das Triplet bei 1,059 ppm (vom 18-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub> von (1b)) zunimmt. Die Differenz der chemischen Verschie-

Tab. 7: <sup>1</sup>H-NMR-Daten von Z-E-isomeren Bilindionen: Verschiebung der Methinresonanzen (E minus Z; ppm)

| Bilindion                          | 5-H    | 15-H   | 10-H   | Lösungsmittel     | Literatur            |
|------------------------------------|--------|--------|--------|-------------------|----------------------|
| Phytochrom-Chromopeptid (1a; 16a)  | -0,057 | +0,195 | +0,012 | a                 | -                    |
| Phycocyanin-Chromopeptid (1b; 16b) | -0,056 | +0,195 | +0,018 | a                 | -                    |
| A-Dihydrobilindion (19), 15E       | -0,07  | +0,23  | -0,01  | CDCl <sub>3</sub> | Blacha-Pulver (1979) |
| Biliverdin (3), 15E                | -0,09  | +0,16  | -0,06  | CDCl <sub>3</sub> | Falk et al. (1978b)  |
| Biliverdin (3), 4E                 | +0,23  | -0,04  | -0,02  | CDCl <sub>3</sub> | Falk et al. (1978b)  |
| OEBV (12), 15E (14)                | 0      | +0,27  | 0      | b                 | -                    |
| DHOEBV (6), 15E                    | 0      | +0,23  | 0      | CDCl <sub>3</sub> | -                    |
| A-Dihydrobilindion (18), 15E       | -0,09  | +0,29  | -0,03  | CDCl <sub>3</sub> | Falk et al. (1983)   |
| A-Dihydrobilindion (18), 4E        | +0,43  | +0,08  | +0,26  | CDCl <sub>3</sub> | Falk et al. (1983)   |

a) Aceton- $d_6$ /H<sub>2</sub>O/CF<sub>3</sub>COOH

b) CDCl<sub>3</sub>/CF<sub>3</sub>COOH

bungen ( $\Delta\delta$  (16b) minus (1b): -0,053 ppm) korrespondiert mit den Differenzen, die für die Modellchromophore (19) ( $\Delta\delta$ : -0,05)

und (20) ( $\Delta\delta$ : -0,03 ppm; Blacha-Puller, 1979; Gossauer et al., 1981) beschrieben wurden. Die Mischung von (1b) und (16b) zeigt vier Dubletts in dem Bereich von 1,40 und 1,20 ppm, die sich teilweise überlappen (und teilweise mit einer Lösungsmittelresonanz bei 1,24 ppm) und bei Belichtung in zwei Dubletts bei 1,345 und 1,295 ppm durch eine parallele Verschiebung ( $\Delta\delta$ : 0,04 ppm) zusammenfallen. Letztere werden dem 2-CH<sub>3</sub> von (1b) zugeordnet. In früheren NMR-Messungen konnte nur ein Dublett für das 2-CH<sub>3</sub> gefunden werden. Im Gegensatz zu diesen Messungen wurde das ZZE-konfigurierte PC-Chromopeptid (16b) photochemisch aus (1b) präpariert (siehe Kap. II.3.1.2). Falls diese Reaktion von einer Epimerisierung am C2 begleitet würde, wären zwei Resonanzen für die 2-CH<sub>3</sub> Protonen zu erwarten. Die Gegenwart von vier Dubletts im Spektrum der Mischung aus (1b) und (16b) (Abb. 17 B) impliziert, daß die Aufspaltung der 2-CH<sub>3</sub> Resonanz in der E-Komponente ebenfalls gegenwärtig ist und nicht bei der Konversion zur Z-Komponente stattfindet. Das Multiplett bei 1,44 ppm ergibt bei Belichtung ein Dublett bei 1,448 ppm. Es kann den 3'-CH<sub>3</sub> Protonen zugeordnet werden. Damit setzt sich das Multiplett aus den zwei, sich gegenseitig überlappenden Dubletts der 3'-CH<sub>3</sub> Protonen von (1b) und (16b) zusammen. Der Unterschied der chemischen Verschiebungen beträgt nur 0,01 ppm. Belichtung führt auch zum Verschwinden der Resonanz bei 3,14 ppm mit einer korrespondierenden Zunahme der Resonanz bei 3,19 ppm. Man kann sie dem 3H von (1b) bzw. (16b) zuordnen, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß sie zum Cystein  $\beta$ -CH<sub>2</sub> oder Arginin  $\delta$ -CH<sub>2</sub> gehören (siehe Tab.10). Bei Belichtung verschwindet das Singulett bei 1,849 ppm und ist deshalb ein (16b) spezifisches Signal. Man kann es den 17-CH<sub>3</sub> Protonen zuordnen, denn in Bezug auf die 7, 14 und 17-CH<sub>3</sub> Resonanzen der Modellchromophore (19) und (20) zeigt die 17-CH<sub>3</sub> Resonanz die stärkste Verschiebung zu höherem Feld bei der Z-E-Isomerisierung ( $\Delta\delta$ : -0,16 bzw. -0,07 ppm). Die korrespondierende Resonanz von (1b) wird vom Aceton-Lösungsmittelpack verdeckt. Die Resonanzen der anderen

Tabelle 8) 500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Daten der Chromophore der Chromopeptide von Phycocyanin und Phytochrom  
in Aceton- $d_6/\text{H}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COOH}$

| Chemische Verschiebung <sup>a</sup> , Multiplizität und J (Hz) |                                  |                                   |                                   | Zuordnung                                                |              | Chemische Verschiebung <sup>b</sup> , Multiplizität und J (Hz) von PC-Chromopeptid in D <sub>2</sub> O |
|----------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Phycocyanin-Chromopeptid                                       |                                  | Phytochrom-Chromopeptid           |                                   |                                                          |              |                                                                                                        |
| ZZZ (1b)                                                       | ZZE (16b)                        | P <sub>r</sub> ' (1a)             | P <sub>fr</sub> ' (16a)           |                                                          |              |                                                                                                        |
| 1,295 d (7,5)                                                  | 1,255 d (7,5)                    | 1,29 m                            | 1,24 m                            | 2-CH <sub>3</sub>                                        | 1,21 d (7,3) |                                                                                                        |
| 1,345 d (7,5)                                                  | 1,304 d (7,5)                    |                                   |                                   |                                                          |              | 1,44 d (7,1)                                                                                           |
| 1,448 d (6,8)                                                  | 1,44 m                           | 1,417 d (6,8)                     | 1,386 d (6,8)                     | 3'-CH <sub>3</sub>                                       |              |                                                                                                        |
| $\langle 2,085 \text{ s} \rangle$                              | 1,849 s                          | $\langle 2,084 \text{ s} \rangle$ | n.b.                              |                                                          |              | 2,11 s                                                                                                 |
| n.b.                                                           | n.b.                             | $\langle 2,089 \text{ s} \rangle$ | $\langle 2,098 \text{ s} \rangle$ | 7,13,17-CH <sub>3</sub> 's                               |              | 2,15 s                                                                                                 |
| n.b.                                                           | n.b.                             | 2,221 s                           | n.b.                              |                                                          |              | 2,17 s                                                                                                 |
| 1,059 t (7,5)                                                  | 1,006 t (7,5)                    | -                                 | -                                 | 18-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>                      | 1,02 t (7,4) |                                                                                                        |
| $\langle 2,35 \text{ m} \rangle$                               | $\langle 2,29 \text{ m} \rangle$ | -                                 | -                                 | 18-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>                      | 2,23 q       |                                                                                                        |
| 2,61 m                                                         | 2,61 m                           | 2,58 m                            | 2,58 m                            | 8,12-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> H | 2,69 m       |                                                                                                        |
| 3,07 m                                                         | 3,07 m                           | 3,04 m                            | 3,04 m                            | 8,12-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> H | 3,11 m       |                                                                                                        |
| $\langle 2,61 \rangle$                                         | $\langle 2,61 \rangle$           | $\langle 2,58 \rangle$            | $\langle 2,58 \rangle$            | 2-H                                                      | 2,69 dq      |                                                                                                        |
| $\langle 3,19 \text{ m} \rangle$                               | $\langle 3,14 \text{ m} \rangle$ | $\langle 3,20 \rangle$            | $\langle 3,12 \text{ m} \rangle$  | 3-H                                                      | 3,11 m       |                                                                                                        |
| 3,58                                                           | 3,58 m                           | n.b.                              | n.b.                              | 3'-H                                                     | 3,58 m       |                                                                                                        |
| 5,999 s                                                        | 5,943 s                          | 5,995 s                           | 5,938 s                           | 5-H                                                      | 5,94 s       |                                                                                                        |
| 6,239 s                                                        | 6,434 s                          | 6,538 s                           | 6,533 s                           | 15-H                                                     | 6,32 s       |                                                                                                        |
| 7,601 s                                                        | 7,619 s                          | 7,618 s                           | 7,630 s                           | 10-H                                                     | 7,41 s       |                                                                                                        |

a) Die chemischen Verschiebungen in Aceton- $d_6/\text{H}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{COOH}$  sind in parts per million bezogen auf Aceton- $d_6$  (2,050 ppm) angegeben; b) entnommen aus Igaridas et al. (1979); n.b. = nicht bestimmt; ppm-Werte in  $\langle \rangle$ : Zuordnung unsicher

aromatischen Methylprotonen von (1b) und (16b) werden ebenfalls von dem Acetonpeak im Bereich um 2 ppm verdeckt, deshalb ist deren genaue Position unsicher. Eine weitere Resonanz bei 2,29 ppm verschwindet bei der Belichtung. Sie könnte den 18-CH<sub>2</sub> Protonen von (16b) zugeordnet werden. Die korrespondierende Resonanz von (1b) ist unsicher. Für das entsprechende Signal wurde für (19) bei der E-Z Reversion eine Verschiebung zu höherem Feld von 0,11 ppm und für (20) um 0,01 ppm gemessen. Wenn man für das Peptid eine ähnliche Verschiebung der Methylenprotonen der 18-Ethylgruppe annimmt, wären deren Resonanz bei (1b) vom Acetonpeak verdeckt. Das Verschwinden der Resonanz bei 2,29 ppm korrespondiert mit der Zunahme des Multipletts bei 2,35 ppm und es wird deshalb vorläufig den 18-Methylenprotonen von (1b) zugeordnet. Allerdings ist die Abnahme der Intensität bei 2,29 ppm größer als die Zunahme der Intensität bei 2,35 ppm, und eine Überlappung der 18-Methylenprotonenresonanz mit Aminosäureresonanzen an dieser Stelle ist möglich (eventuell mit dem  $\beta$ -CH<sub>2</sub> von Glx, siehe unten). Keine Verschiebung bei Belichtung erfahren die Resonanzen der Methylenprotonen der Propionsäureseitenketten (2,61 und 3,07 ppm) und die Resonanz vom 3'-H (3,58 ppm). Jedoch wird die Form dieser Resonanzen deutlich bei der Belichtung geändert. Die Resonanz des 2-H wird wahrscheinlich von der Resonanz der  $\alpha$ -Methylenprotonen der Propionsäureseitenketten verdeckt und scheint bei der Reversion von E nach Z nur einer geringen Verschiebung zu unterliegen.

#### 5.2.2. Die Chromophorresonanzen des P<sub>r</sub>'- und P<sub>fr</sub>'-Chromopeptides

Das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des P<sub>r</sub>'-Chromopeptides zeigt die Abbildung 17 A'. Wegen der geringen Konzentration des Phytochrom-Chromopeptides ( $9,4 \times 10^{-5}$ M) sind dessen Resonanzen im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum sehr schwach, deshalb ist deren Zuordnung schwieriger als im Spektrum des PC-Chromopeptides. Frühere Messungen

des  $P_r'$ -Chromopeptides (1a) in Pyridin- $d_5$  (Lagarias und Rapoport, 1980) ergaben eine große Übereinstimmung der Chromophorsignale des  $P_r'$ - und des ZZZ-PC-Chromopeptids (1b). Da diese auch im beschriebenen Lösungsmittelsystem nicht verloren gehen, konnten die (1a) Resonanzen durch Vergleich mit den Daten für (1b) zugeordnet werden. Dies war insbesondere für die Zuordnung der Methinresonanzen der Fall (vergleiche Abb. 17 A' und B'). In Übereinstimmung mit Lagarias und Rapoport (1980) besitzen die 5-H und 10-H Resonanzen in (1a) und in (1b) fast identische chemische Verschiebungen, und das 15-H ist in (1a) im Vergleich zu (1b) zu niederem Feld verschoben. In Pyridin- $d_5$  wird dies allerdings weniger deutlich ( $\Delta\delta$ : 0,08 ppm) als in Aceton- $d_6$ /H<sub>2</sub>O TFA ( $\Delta\delta$ : 0,299 ppm).

Wegen Dunkelreversion vom  $P_{fr}'$ - zum  $P_r'$ -Chromopeptid enthält das <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum vom  $P_{fr}'$ -Chromopeptid (Abb. 17 A) Resonanzen beider Komponenten, die bei Belichtung in die Resonanzen vom  $P_r'$ -Chromopeptid zusammenfallen (Abb. 17 A'). Der Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der Abb. 17 A und 17 B zeigt, daß sowohl das 5-H als auch das 10-H in (16a) und (16b) gleiche chemische Verschiebungen besitzen. Die Differenz aus den chemischen Verschiebungen der 5-H bzw. der 10-H Protonen von (1a) und (16a) und von (1b) und (16b) sind demnach identisch (siehe Tab. 7) und implizieren für das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid ebenfalls die 15E-Chromophorkonfiguration. Die Resonanz des 15-H ist bei (16b) im Vergleich zu (1b) um 0,195 ppm zu niederem Feld verschoben. An der entsprechenden Stelle im Spektrum des  $P_{fr}'$ -Chromopeptides (Abb. 17 A) ist ein Singulett sichtbar, das aber weniger deutlich erkennbar ist, da es mit einem Spike interferiert. Es verschwindet bei Belichtung korrespondierend mit der Zunahme der 15-H Resonanz von (1a). Damit ist auch für das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid die 15E-Chromophorkonfiguration bewiesen, und das Photoadditionsmodell (Krauss und Scheer, 1981) konnte im NMR-Experiment keine Bestätigung finden.

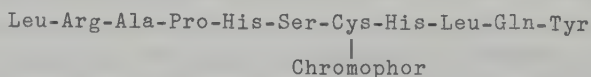
Durch Vergleich der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren von (1a) und (16a) mit denen von (1b) und (16b) können auch die anderen (soweit erkenn-

bar) Chromophorresonanzen der Phytochrom-Chromopeptide wie folgt zugeordnet werden: Die Multipletts bei 2,58 und 3,04 ppm den Methylenprotonen der beiden Propionsäureseitenketten, das Dublett bei 1,417 ppm den 3'-CH<sub>3</sub> Protonen. Das Singulett bei 2,221 ppm, das bei Belichtung zunimmt, kann den 13-Methylprotonen zugeordnet werden, da diese in Pyridin-d<sub>5</sub> (Lagarias und Rapoport, 1980) im Vergleich zu allen anderen aromatischen CH<sub>3</sub>-Gruppen eine Resonanz im niedrigsten Feld zeigen. Die Resonanzen der 17- und 7-CH<sub>3</sub> Protonen werden vom Aceton-Lösungsmittelpeak verdeckt, deren Zuordnung ist deshalb unsicher. Wegen des ungünstigen Signal-Rauschverhältnisses der <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der Phytochromchromopeptide kann das 3'-H nicht identifiziert werden. Für die 2-CH<sub>3</sub>-Protonen von (1a) wird ein Multiplett bei 1,29 ppm beobachtet, obwohl ein Dublett für diese Resonanz zu erwarten ist (Lagarias und Rapoport, 1980). Dies könnte seine Ursache in einem Aufspalten des Signales haben, wie es für (1b) beobachtet wurde, könnte aber auch die Folge eines Überlappens mit einem anderen Signal sein (eventuell mit den β-CH<sub>3</sub>-Protonen von Alanin). Im Gegensatz zum PC-Chromopeptid scheint hier ein Splitting des Signals weniger denkbar, da dann der Abstand der beiden Dubletts in (1a) geringer wäre als in (1b) und das P<sub>fr</sub>'-Chromopeptid nicht über einen photochemischen Reaktionszyklus wie das E-PC-Chromopeptid erhalten wurde. Gerade diese Reaktionsfolge wird aber im Falle des PC-Chromopeptides als Ursache für die Signalaufspaltung betrachtet. In Übereinstimmung mit Lagarias und Rapoport (1980) können im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des P<sub>fr</sub>'-Chromopeptids keine Resonanzen einer Ethylgruppe gefunden werden, da diese beim Phytochromobilin durch eine Vinylgruppe ersetzt ist (1). Die Resonanzen der Vinylgruppe wären im Bereich von 5-7 ppm zu erwarten gewesen (Lagarias und Rapoport, 1980), sie können aber wegen der hohen Multiplizität dieser Resonanzen und dem ungünstigen Signal-Rauschverhältnis des NMR-Spektrums nicht eindeutig identifiziert werden. P<sub>fr</sub>'-Chromopeptid-spezifische Resonanzen können an ihren lichtinduzierten Verschie-

bungen erkannt werden. Dies trifft für die Resonanz der  $2\text{-CH}_3$  Protonen zu. Sie überlappt sich allerdings mit einem Lösungsmittelpeak bei 1,23 ppm, der auch in der PC-Chromozeptidpräparation erscheint, jedoch zeigt die gegensinnige Änderung der Intensität der Signale bei 1,23 und 1,29 ppm bei der Umwandlung des  $P_{fr}'$ - in das  $P_r'$ -Chromozeptid eine Verschiebung der  $2\text{-CH}_3$  Resonanz von rund 0,05 ppm zu niederem Feld an. Im PC-Chromozeptid beträgt er 0,04 ppm für die entsprechende Resonanz (Tab. 8). Das Multipllett bei 3,12 ppm verschwindet bei Belichtung und könnte in Analogie zum PC-Chromozeptid dem 3-H zugeordnet werden. Das korrespondierende Signal des  $P_r'$ -Chromozeptids könnte unter der nicht identifizierten Resonanz bei 3,20 ppm verborgen liegen. Allerdings sind in diesem Bereich auch Signale von Cystein und Arginin zu erwarten (siehe Tab. 10). In Übereinstimmung mit dem PC-Chromozeptid erfahren die Methylenresonanzen der Propionsäureseitenketten (2,58 und 3,04 ppm) und des 2-H (2,58 ppm) im Phytochrom-Chromozeptid keine Verschiebung bei Belichtung, nur eine Änderung in der Form der Resonanzen ist feststellbar. In Übereinstimmung mit Lagarias und Rapoport (1980) sind auch im Aceton- $d_6/H_2O$ /TFA-Lösungsmittelsystem die Resonanzen der aromatischen Methylenprotonen im Phytochrom gegenüber dem PC-Chromozeptid etwas zu niederem Feld verschoben. Aus diesem Grund ist im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum von (16b) die, im Vergleich zu (1b) deutlich zu höherem Feld verschobene Resonanz der  $13\text{-CH}_3$ -Protonen erkennbar (Abb. 17 B), im Spektrum vom  $P_{fr}'$ -Chromozeptid ist sie dagegen vom Acetonpeak überdeckt. Dafür kann im Spektrum von  $P_r'$ -Chromozeptid (Abb. 17 A') die Resonanz der  $17\text{-CH}_3$  Protonen nicht identifiziert werden, die im Spektrum von (1b) vom Acetonpeak überdeckt wird. Das Signal bei 2,25 ppm im Spektrum von (1b) (Abb. 17 B') wird einer Aminosäure zugeordnet (wahrscheinlich gehört es zum  $\beta\text{-CH}_2$  von Glx; siehe Tab. 10), da die Resonanzen der Chromophormethylprotonen scharfe Singulett darstellen (z.B. vom  $17\text{-CH}_3$  in Abb. 17 A' oder vom  $13\text{-CH}_3$  in Abb. 17 B)

### 5.2.3. Die Aminosäureresonanzen der Phytochrom- und Phycocyaninchromopeptide

Um die Aminosäureresonanzen in den  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren zuordnen zu können, ist es notwendig, die Aminosäurezusammensetzungen der untersuchten Chromopeptide zu kennen. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse der Aminosäureanalysen der für die NMR-Messungen eingesetzten Chromopeptide angegeben. Durch Pepsin- und Thermolysinabbau von Phytochrom erhielten Lagarias und Rapoport (1980) eine Mischung verschiedener Chromopeptide mit unterschiedlichen Längen der kovalent gebundenen Peptidketten, die mit Hilfe von Hochdruckflüssigkeitschromatographie aufgetrennt werden konnten. Im Gegensatz dazu wurde wegen der Instabilität des Chromophors zur Präparation von  $\text{P}_{\text{fr}}'$ -Chromopeptiden nur ein kurzer Pepsinabbau und eine schnelle Abtrennung des  $\text{P}_{\text{fr}}'$ - vom  $\text{P}_{\text{r}}'$ -Chromopeptid und farblosen Peptidbruchstücken durchgeführt (siehe Kap. II.2.1.). Eine Auftrennung des  $\text{P}_{\text{fr}}'$ -Chromopeptidgemisches konnte dabei nicht erzielt werden. Im Falle des Phycocyanins wurden die Chromopeptide intensiv gereinigt und aufgetrennt (siehe Kap. II.3.1.2.). Die Präparationsunterschiede äußern sich in der Aminosäureanalyse, die für die Phytochromchromopeptid-Präparation eine wesentlich größere Zahl nachweisbarer Aminosäuren ergibt als für die PC-Chromopeptidpräparation (Tab. 9). Die Aminosäuresequenz wurde von Lagarias und Rapoport (1980) für ein Phytochromundekapeptid bestimmt. Sie lautet:

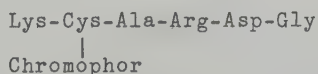


Der Chromophor ist über Cystein an die Peptidkette gebunden (1a). Die Aminosäuresequenz für das untersuchte PC-Chromopeptid wurde nicht ermittelt. Dem Ergebnis der Aminosäure-

Tabelle 9: Aminosäureanalyse vom PC- und P<sub>r</sub>'-Chromopeptid im Anschluß an die NMR-Messungen. Die Werte geben molare Relationen wieder bezogen auf Gly = 1,0 (näherungsweise)

| Aminosäure          | PC-Chromopeptid | P <sub>r</sub> '-Chromopeptid |
|---------------------|-----------------|-------------------------------|
| CySO <sub>3</sub> H | 0,38 (1)        | 0,62 (1)                      |
| Asx                 | 2,30 (2)        | 0,87 (1)                      |
| Thr                 | 0               | 0,33                          |
| Ser                 | 0               | 1,11 (1)                      |
| Glx                 | 0,86 (1)        | 2,26 (2)                      |
| Gly                 | <u>1,00</u> (1) | <u>1,00</u> (1)               |
| Ala                 | 2,00 (2)        | 2,09 (2)                      |
| Val                 | 0               | 0,66 (1)                      |
| Ile                 | 0               | 0,43                          |
| Leu                 | 0               | 3,22 (3)                      |
| Tyr                 | 0               | 0,87 (1)                      |
| Phe                 | 0               | 0,45                          |
| His                 | 0               | 2,86 (3)                      |
| Lys                 | 1,44 (1)        | 0,49                          |
| Arg                 | 1,16 (1)        | 2,17 (2)                      |

analyse zufolge könnte es von der  $\alpha$ -Untereinheit des C-Phycocyanins stammen, mit der folgenden Aminosäuresequenz an der Chromophorbindungsstelle:



(Bestimmt für die Rotalge Cyanidium caldarium; Offner et al., 1981). Die Aminosäureresonanzen sind in Tabelle 10 aufgelistet. Die Zuordnung erfolgte durch Vergleich bekannter Daten für Chromopeptide in anderen Lösungsmitteln (Lagarias et al., 1979;

Tabelle 10: 500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Daten der Peptidketten der Chromopeptide von Phytochrom und Phycocyanin in Aceton- $\text{d}_6$ /H $_2\text{O}$ /TFA; 80 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Daten freier Aminosäuren im selben Puffersystem und 360 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Daten der Peptidkette vom Phytochromchromopeptid in D $_2\text{O}$  (chemische Verschiebung in ppm, Multiplizität und J (Hz))

| Phycocyanin-chromopeptid<br>Aceton- $\text{d}_6$ / H $_2\text{O}$ / CF $_3$ COOH | Phytochrom-chromopeptid                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Freie Aminosäuren | Phycocyanin-chromopeptid <sup>a</sup><br>D $_2\text{O}$                                  | Zuordnung                         |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <u>b</u>                                                                         | 0,900 m                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 0,95 d (5,9)      | 0,77 d (5,3)                                                                             | Leu <sup>1-3</sup> $\delta_1$ -CH |
|                                                                                  | 0,840 d(5,4)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 0,95 d (5,9)      | 0,83 d (5,3)                                                                             | Leu <sup>1</sup> $\delta_2$ -CH   |
|                                                                                  | 0,815 d(5,4)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                   |                                                                                          | Leu <sup>2</sup> $\delta_2$ -CH   |
|                                                                                  | 0,793 d(5,4)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                   |                                                                                          | Leu <sup>3</sup> $\delta_2$ -CH   |
|                                                                                  | 1,028 d(6,1)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 1,09 (7,0)        |                                                                                          | Val $\delta_1/\delta_2$ -CH       |
| 1,401 d(7,5)                                                                     | n.b.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 1,61 d (7,4)      | 1,29 d (7,2)                                                                             | Ala <sup>1</sup> $\beta$ -CH      |
| 1,622 d(7,5)                                                                     | n.b.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                   | 1,51 d (7,2)                                                                             | Ala <sup>2</sup> $\beta$ -CH      |
| 1,65-1,80                                                                        | n.b.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 1,6-2,0           | 1,54-1,64                                                                                | Arg $\beta/\delta$ -CH            |
| 2,25                                                                             | n.b.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 2,32              |                                                                                          | Glx $\beta$ -CH                   |
| 2,84 m                                                                           | 2,90 m                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        | 3,13 d (5,4)      | 2,77dd(7,8/16,8) <sup>3</sup> <sub>1</sub><br>2,87dd(5,9/16,8) <sup>4</sup> <sub>2</sub> | ASx <sup>1</sup> $\beta$ -CH      |
| 2,92 m                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                   |                                                                                          | ASx <sup>2</sup> $\beta$ -CH      |
| 3,20-3,30                                                                        | <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,15-3,25</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,11dd(6,8/13,9)<sup>4</sup><sub>2</sub></div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,66dd(40/76)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,39 t (5,6)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,22dd(28/65)</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; font-size: 4em; margin: 0 10px;">{</div> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle;"> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; margin-right: 10px;">3,02dd(7,6/13,9)<sup>3</sup><sub>1</sub></div> </div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div> |                   |                                                                                          |                                   |

Lagarias und Rapoport, 1980) und durch Kontrollmessungen der freien Aminosäuren im Aceton- $d_6$ /H<sub>2</sub>O/TFA-Lösungsmittelsystem. Bis auf wenige Ausnahmen stimmen die Ergebnisse der <sup>1</sup>H-NMR-Messungen mit den Aminosäureanalysen überein: Während die erwarteten Alaninresonanzen im NMR-Spektrum des PC-Chromopeptides präsent sind, können sie nicht mit Sicherheit im Spektrum des Phytochromchromopeptides nachgewiesen werden. Weitere Resonanzen, die im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum des Phytochromchromopeptides aufgrund der Aminosäureanalyse zu erwarten gewesen wären, wegen Überlappung mit den Lösungsmittelpeaks oder wegen dem hohen Grundrauschen des NMR-Spektrums nicht oder nur unsicher identifiziert werden können (im Gegensatz zum PC-Chromopeptid), sind die Methylenprotonen und die  $\alpha$ -CH-Protonen aller Aminosäuren. Nur die  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Protonen des (der) Asparagin(säure) können zweifelsfrei identifiziert werden (Multiplett bei 2,90 ppm). Die Resonanzen bei 8,81 und 7,42 ppm im Spektrum des P<sub>r</sub>'-Chromopeptides (Abb. 17 A') wurden den Ringprotonen des Histidins zugeordnet. Die Zahl von zwei bis drei Histidinen, die die Aminosäureanalyse ergab, kann im NMR-Spektrum aber nicht zweifelsfrei bestätigt werden. Deutlich wird jedoch, daß die beiden Signale bei der Belichtung eine Verschiebung erleiden (vergleiche Abb. 17 A und A'). Die Resonanzen bei 7,016 und 6,677 ppm im Spektrum des P<sub>r</sub>'-Chromopeptids wurden den Ringprotonen des Tyrosins zugeordnet, und sie zeigen ebenfalls kleine Verschiebungen bei der Phototransformation vom P<sub>fr</sub>'- zum P<sub>r</sub>'-Chromopeptid. Bis auf die  $\delta_1/\delta_2$ -CH<sub>3</sub> Resonanzen des Valins zeigen überhaupt alle eindeutig identifizierten Aminosäuresignale im NMR-Spektrum des Phytochromchromopeptides kleine, aber signifikante Verschiebungen bei der Phototransformation. Dies deutet auf nicht identifizierte Wechselwirkungen der Peptidkette im Phytochromchromopeptid mit dem Chromophor hin, die bereits bei der CD-Messung am P<sub>fr</sub>'-Chromopeptid beobachtet wurden (siehe Kap. II.4.1.). Interessanterweise konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den chemischen Verschie-

bungen der Aminosäureprotonen im E- und Z-konfigurierten PC-Chromopeptid festgestellt werden. Lediglich die  $\beta$ -CH<sub>2</sub>-Protonen des (der) Glutamin(säure) scheinen in dieser Hinsicht eine Ausnahme zu bilden (siehe Abb. 17 B').

## 6. Schlußfolgerungen aus den Spektralmessungen

Geometrische Isomerisierung des Chromophors während der Photokonversion des Phytochroms wurde schon früh vermutet (Siegelmann und Hendricks, 1965; Linschitz und Kasche, 1966; Burke et al., 1972; Suzuki et al., 1975). Die <sup>1</sup>H-NMR-Untersuchungen am photosensiblen Phytochrom-Chromopeptid bestätigen diese Annahme und lokalisieren die Z-E-Isomerisierung des Chromophors erstmals. Allerdings bereitet die Übertragung der Eigenschaften der Phytochrom-Chromopeptide auf die Eigenschaften der intakten, photoreversiblen Phytochromchromophore Schwierigkeiten. Nur im Falle des P<sub>fr</sub>'-Chromopeptides besteht in Analogie zu P<sub>fr</sub> eine empfindliche Photosensibilität des Chromophors gegenüber Rotlichtbestrahlung. Das P<sub>r</sub>'-Chromopeptid ist gegenüber Belichtung stabil, und dessen E-Z-Isomerisierung kann nur auf dem Weg über dessen rubinoides Zwischenprodukt erfolgen und hat demnach ihr Wirkungsoptimum im blauen Spektralbereich (siehe Kap. II.3.1.2.). Dagegen erfolgt die Phototransformation von P<sub>r</sub> mit hoher Quantenausbeute bei Rotlichtbestrahlung. Arbeiten der Arbeitsgruppe um Falk zeigen aber, daß diese Tatsachen keinen Widerspruch zu den Verhältnissen im intakten Phytochrom darstellen müssen, sondern diese eine Folge der unterschiedlichen Konformationen der Chromophore in den Chromopeptiden und dem intakten Phytochrom sind. Falk und Thirring (1980) konnten zeigen, daß die Photoisomerisierung bevorzugt an den Methinbrücken von Bilatrienen-abc stattfindet, die aufgrund sterischer Einflüsse bereits stark unter "Spannung" stehen.

Aus diesem Grund isomerisieren E-konfigurierte Bilatriene-abc, bei denen die Verdrillung der betroffenen Methinbrücke durch deren spektrale Entkopplung aus dem Konjugationssystem angezeigt ist (siehe Kap. II.2.2.), sehr leicht zurück zur stabilen all-Z-Form, in der die Spannung der Methindoppelbindungen am geringsten ist. Bringt man aber auch den all-Z-Chromophor durch sterische Wechselwirkungen in einen gespannten Zustand, so besitzen die E- und Z-stereoisomeren Chromophore gleich große Stabilität, und bei Weißlichtbestrahlung liegen dann beide Formen im Gleichgewicht vor. Sterische Spannung in freien Bilatrienen-abc kann durch N-Methylierung einzelner Pyrrolstickstoffe erzielt werden (Falk und Thirring, 1980). Wegen ähnlicher Konformation bei der Chromophorspezies besitzen die Z- und E-Formen der N-Methylderivate fast identische Absorptionseigenschaften. Da die E- und Z-konfigurierten Chromopeptide in neutraler Lösung ebenfalls fast identische Absorptionsspektren besitzen (siehe Kap. II.3.2.), sollten diese unter den gegebenen Bedingungen auch ähnliche Chromophorkonformation besitzen. Im Gegensatz zu den N-Methylderivaten ist es aber bei den Chromopeptiden nicht möglich, durch Belichtung der Z-Form direkt ein entsprechendes E-Isomer zu erhalten. Dies macht deutlich, daß die Konformation nicht allein für die Reaktivität der Bilatriene-abc gegenüber E-Z-Isomerisierung verantwortlich ist, vielmehr ist dafür die Zugänglichkeit der verschiedenen Kanäle für strahlungslose Energieabbauprozesse der angeregten Gallenfarbstoffe von entscheidender Bedeutung (zusammengefaßt bei Braslavsky et al, 1983). So kann bei den Bilatrienen-abc Z-E-Isomerisierung dadurch erzwungen werden, daß die E-Z-Isomerisierung (am C-4 bzw. C-15) die bequemste Art für das Chromophormolekül im angeregten Zustand darstellt, seine Energie abzubauen. Dies ist bei der Reversion freier E-konfigurierter Gallenfarbstoffe zu den all-Z-Formen der Fall. Andererseits erfolgt Z-E-Isomerisierung, wenn die anderen Kanäle für den Energieabbau für das an-

geregte Molekül gesperret sind. Zu diesen Kanälen gehören z. B. der intramolekulare Protonenaustausch oder die von Braslavsky et al. (1983) besonders hervorgehobene E-Z-Isomerisierung der C-10-Methinbrücke. Sie sind bei den rubinoiden Gallenfarbstoffen gesperret, deshalb sind diese auch sehr leicht in Lösung zu isomerisieren (siehe Kap. II.3.1.). Die N-Methylderivate der Bilatriene-abc zeigen auch, daß die Konfiguration der einzelnen Methinbrücken für sich selbst nicht für die Absorptionseigenschaften der Chromophore verantwortlich ist, sondern deren sekundärer Einfluß auf die Konformation der Chromophore (Falk und Höllbacher, 1978; Falk und Thirring, 1980). Die Determinierung der C-15 Methinbrücke auf eine reversible E-Z-Isomerisierung im Phytochromchromophor durch Proteineinfluß im Hinblick auf die oben erwähnten Chromophoreigenschaften ist leicht vorstellbar. Daß diese splezifischen Chromophor-Proteinwechselwirkungen aber nicht unbedingt direkt mit der langwelligen Absorption des  $P_{fr}$ -Chromophors in Verbindung stehen müssen, zeigen die Beobachtungen von Yamamoto und Furuya (1983) an proteolytischen Fragmenten des Phytochroms, die trotz veränderter Spektraleigenschaften noch Photoreversibilität besitzen (die mit großer Wahrscheinlichkeit auf reversibler E-Z-Isomerisierung beruht). Somit scheint das Protein bei der Photokonversion des Phytochromchromophors eine doppelte Rolle zu spielen:

- a) Determinierung der C-15 Methinbrücke auf reversible E-Z-Isomerisierung (eventuell durch sterische Verdrillung),
- b) bathochrome Verschiebung der Absorption des E-konfigurierten Chromophors.

Das weite "Auseinanderdriften" der Absorptionsmaxima der E- und Z-konfigurierten Phytochromchromophore hat dann auch zur Folge, daß die beiden Phytochromspezies durch Einstrahlung von monochromatischem Licht in das Absorptionsmaximum

der korrespondierenden Form in sehr hohen Konzentrationen angehäuft werden können (der  $P_r$ -Chromophor bis zu 99% und mehr).

Da die Z-E-Isomerisierung aber nur für die Phytochrompeptide nachgewiesen ist und deshalb nicht automatisch auch für das intakte Phytochrom gelten muß, können die obigen Ausführungen allerdings nur als Hypothese betrachtet werden. Im folgenden Kapitel soll nun noch versucht werden, Hinweise für eine Z-E-Isomerisierung im intakten Phytochrom zu erhalten.

## 7. Die Chromophorstruktur in Phytochromintermediaten und gebleichten Formen des Phytochroms

Mit Hilfe der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, daß der  $P_{fr}'$ -Chromophor das 15E-Isomer des all-Z-konfigurierten  $P_r'$ -Chromophors ist. Damit stellt sich die Frage, ob analog dazu der  $P_{fr}$ -Chromophor das 15E-Isomer des  $P_r$ -Chromophor darstellt. Dies ist zu erwarten, da die Z-E-Isomerisierung eine endergonische Reaktion ist und es als äußerst unwahrscheinlich erscheint, daß sie lediglich einen Proteolyse- bzw. Denaturierungsartefakt darstellt. Dann erhebt sich die Frage, ob die Z-E-Isomerisierung ein früher oder ein später Schritt bei der Photokonversion des Phytochroms ist, da seit langem bekannt ist, daß die Photokonversion von  $P_r$  und  $P_{fr}$  auf getrennten Wegen über verschiedene Zwischenformen verläuft (zusammengefaßt bei Kendrick und Spruit, 1977). Einige dieser Zwischenstufen tragen einen gebleichten Chromophor. Reversibel und irreversibel gebleichte Phytochromspezies können unter bestimmten Bedingungen angehäuft werden (siehe unten), und es war interessant festzustellen, inwieweit sie mit einer bestimmten Chromophorkonfiguration in Verbindung stehen. Um diese Zusammenhänge untersuchen zu können, war es notwendig, intaktes, photoreversibles Phytochrom mit in die Unter-

suchung einzubeziehen. Dabei standen UV-Vis- und CD-Spektroskopie im Vordergrund. Wegen der Größe des Moleküls ergaben  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen an intaktem Phytochrom nur höchst zweifelhafte Ergebnisse (Song et al., 1982).

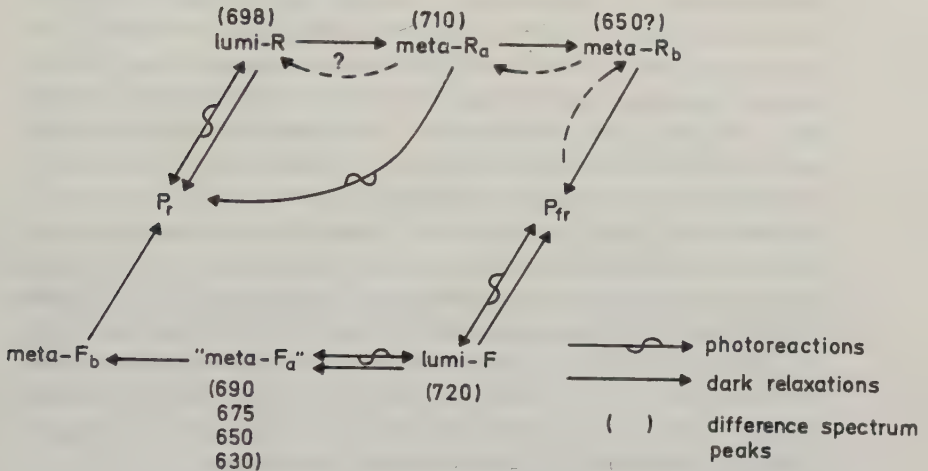
#### 7.1. Intermediate bei der Photokonversion des Phytochroms

Die Intermediate der Photokonversion des Phytochroms konnten mit verschiedenen Untersuchungsmethoden nachgewiesen werden: Blitzlichtphotolyse, Tieftemperaturspektroskopie, Dehydratisierung des Proteins und Pigmentcycling (gleichzeitiges Anregen von  $P_r$  und  $P_{fr}$ ). Die Ergebnisse aus diesen Experimenten wurden von Kendrick und Spruit in dem Schema zusammengefaßt, das in Abb. 19 wiedergegeben ist. In erster Linie bezieht es sich allerdings auf die Ergebnisse aus Tieftemperaturmessungen. Die Absorptionsdaten der Intermediate in diesem Schema wurden alle aus Absorptionsdifferenzspektren entnommen und sind deshalb nur mit Vorbehalt zu betrachten (siehe unten).

Die Nomenklatur der Phytochromintermediate wurde von Spruit und Kendrick (1975) in Anlehnung an die Nomenklatur der Rhodopsinintermediate eingeführt. Dabei erhält das erste faßbare Produkt der Phototransformation das Präfix "lumi", und die nachfolgenden Produkte der Dunkelrelaxation dieses Produktes erhalten das Präfix "meta".

Tieftemperaturmessungen und Messungen an dehydratisiertem Phytochrom ergaben, daß für den Übergang von meta-Ra zu  $P_{fr}$  und von meta-Fa zu  $P_r$  ein bewegliches, hydratisiertes Protein notwendig ist. Aus diesen Beobachtungen schließen Spruit und Kendrick (1975), daß bei diesem Schritt größere Konformationsänderungen des Proteins stattfinden müssen, während Reaktionen, die auch bei tiefer Temperatur bzw. in dehydratisiertem Phytochrom ablaufen, auf den Chromophor selbst be-

Abb. 19: Zusammenfassung der Daten über die Intermediate der Photokonversion des Phytochroms (entnommen aus Kendrick und Spruit, 1977)



schränkt sind. In Analogie dazu ist die Kinetik der P<sub>fr</sub>- bzw. P<sub>r</sub>-Bildung aus den meta-Vorläufern sehr langsam (eine bis mehrere Sekunden) im Vergleich zu der Lebensdauer der ersten Intermediate (rund 70 us). Es ist auch durchaus vorstellbar, daß der im Vergleich zum Protein winzige Chromophor (MG rund 600) schnelle Änderungen durchführen kann, denen das träge Protein (MG<sub>min</sub><sup>a</sup> = 60 000) nur verzögert folgt.

- a) Phytochrompeptide mit einem kleineren Molekulargewicht besitzen keine Photoreversibilität mehr.

In letzter Zeit wurden von einigen Autoren ältere Arbeiten über die Kinetik nach einem Lichtblitz an 120 KD-Phytochrom wiederholt und vertieft (Shimazaki et al., 1980; Cordonnier et al., 1981; Pratt et al., 1982; Inoue et al., 1982). Mit Hilfe neuer Meßtechniken konnten einerseits die Meßzeiten verkürzt werden (Braslavsky et al., 1980a), andererseits wurden im Gegensatz zu den ersten Messungen Absorptionsspektren, und nicht nur Differenzspektren aufgenommen. Dies ist von großem Vorteil, da die Interpretation von Differenzspektren ohne Kenntnis der zugrundeliegenden Absorptionsspektren zu falschen Ergebnissen führen kann (siehe unten).

Die neuesten Blitzlichtarbeiten bestätigen im Wesentlichen die Ergebnisse aus den älteren Arbeiten, die alle am 60 KD-Phytochrom gewonnen wurden. Insbesondere bestätigen sie die frühere Annahme, daß Phytochrom auf mehreren parallelen Wegen von  $P_r$  nach  $P_{fr}$  photokonvertiert. Cordonnier et al. (1981) und Vierstra und Quail (1982b) vermuten, daß dies auf einen unterschiedlichen Degradationsgrad des Phytochroms in den eingesetzten Probelösungen zurückgeführt werden kann.

Unter Berücksichtigung aller bisher bekannten Daten über die Photokonversion des Phytochroms kann als sicher gelten: lumi-R absorbiert maximal bei rund 700 nm und meta-R ( $\lambda_{max}$  rund 660 nm) und meta-F ( $\lambda_{max}$  ebenfalls rund 660 nm) sind im Vergleich zu  $P_r$  mehr oder weniger gebleicht. Eine bestimmte Chromophorkonformation konnte den einzelnen Intermediaten bisher nicht zugeordnet werden.

Im Gegensatz zur Blitzlichtphotolyse sind nur wenig neue Daten über die Tieftemperaturspektroskopie vorhanden (Song et al., 1981). Wegen Tieftemperaturmeßproblmen, die Pratt und Butler (1968) diskutieren (Lichtstreuung, temperaturabhängige Absorptionsänderungen) wurden meist nur Differenzspektren und neuerdings vierte Ableitungen der Absorptionsspektren (Song et al., 1981) beschrieben.

## 7.2. Charakterisierung der Phytochromintermediate mit Hilfe der Tieftemperaturspektroskopie

Mit den folgenden Experimente sollte versucht werden, weitergehende Informationen über die Photokonversion des Phytochroms mit Hilfe der Tieftemperaturspektroskopie zu gewinnen. Dabei sollte versucht werden, den einzelnen Intermediaten eine bestimmte Chromophorkonfiguration zuzuordnen, um damit einen Anhaltspunkt zu erlangen, ob, und wenn, auf welcher Stufe, die Z-E-Isomerisierung stattfindet. Dazu war es notwendig, Absorptionsspektren (und nicht nur Differenzspektren) bei tiefen Temperaturen aufzunehmen. Zu diesem Zweck wurde ein Tieftemperaturzusatzgerät für das Zweiwellenlängenphotometer entwickelt (im Detail siehe exp. Teil, Seite 132). Es ermöglicht schnelle Temperaturänderungen, Zugänglichkeit der Probe bei tiefer Temperatur (bis  $-160^{\circ}\text{C}$ ) ohne apparative Streulichtprobleme.

### 7.2.1. Temperaturabhängige Änderungen im Absorptionsspektrum von $P_r$ und $P_{fr}$

Das Abkühlen einer 66proz. wässrigen Glycerinlösung auf tiefe Temperaturen führt zur Bildung eines klaren Glases, in dem Lichtstreuungseffekte vernachlässigt werden können. Absorptionsbanden verschmälern sich mit sinkender Temperatur (Einfrieren von Schwingungsfreiheitsgraden). Dieser Effekt läßt sich auch an  $P_r$  (120 KD) beobachten, das in glycerinhaltigem Phosphatpuffer (66%, v:v) gelöst ist. In Abb. 20 ist das entsprechende Absorptionsspektrum von  $P_r$  bei  $-41$  und  $-144^{\circ}\text{C}$  wiedergegeben. Mit der Bandenverschmälerung ist gleichzeitig eine Absorptionzunahme verbunden. Sie ist annähernd proportional der Temperaturabnahme und beträgt bei der Abkühlung der  $P_r$ -Probe von  $-41$  auf  $-144^{\circ}\text{C}$  rund 18%. Die Bandenverschmälerung hat gleichzeitig eine Verkleinerung des Absorptionsverhältnisses  $A_{615}/A_{665}$

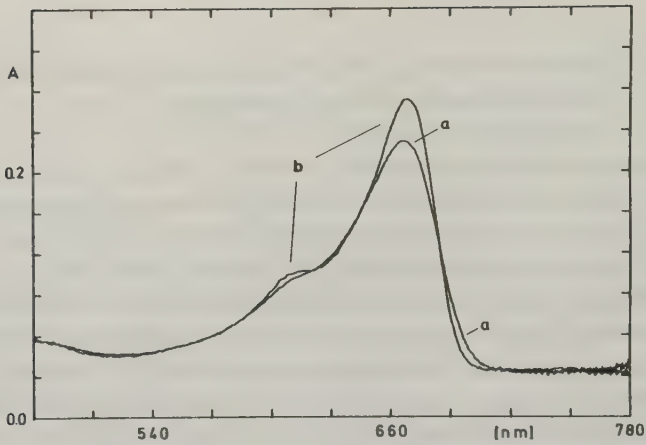


Abb. 20: Absorptionsspektrum von P<sub>r</sub> (120 KD) in glycerinhaltigem 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8 (66%, v:v)  
a) bei -41° C und b) bei -144° C.

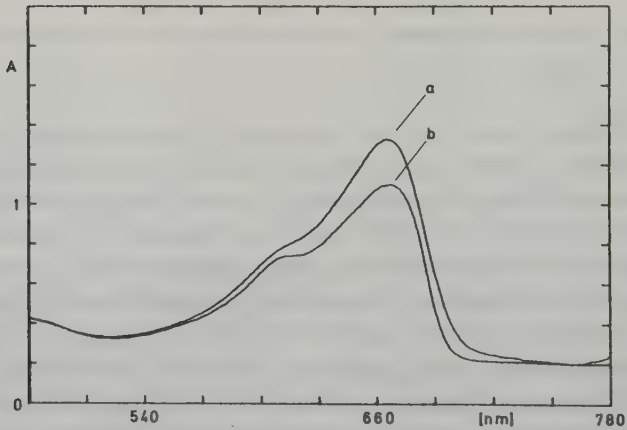


Abb. 21: Absorptionsspektrum von P<sub>r</sub> (120 KD) in gefrorenem 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8; a) bei -30° C und  
b) bei -160° C.

(=Verhältnis von Schulter zu Absorptionsmaximum im  $P_r$ -Spektrum) zur Folge. Es beträgt bei  $-41^\circ \text{C}$  gleich 0,40 und bei  $-144^\circ \text{C}$  gleich 0,35. Anders sind die Verhältnisse für  $P_r$  in Phosphatpuffer ohne Glycerinzusatz. Bei Temperaturen kleiner  $-5^\circ \text{C}$  friert die Probe zu einem festen Eisblock, in dem Lichtstreuung und Reflexion nicht mehr vernachlässigt werden können. Dies führt zu einer Absorptionszunahme in der Probe um den Faktor von rund 1,7 (verlängerter Lichtweg). Im Gegensatz zur Glycerinprobe führt ein weiteres Abkühlen der gefrorenen Probe neben der Bandenverschmälerung zu einer Abnahme der Absorption im Maximum. In Abb. 21 ist das Absorptionsspektrum von  $P_{fr}$  in Kaliumphosphatpuffer bei  $-30^\circ \text{C}$  und bei  $-160^\circ \text{C}$  wiedergegeben. Die Absorptionsabnahme beträgt hier etwa 19%. Der Ausbleichfaktor wird noch größer, wenn man die bei der Glycerinprobe beobachtete Absorptionszunahme bei abnehmender Temperatur mit berücksichtigt. So würde sich beim Abkühlen der gefrorenen  $P_r$ -Probe von  $-30^\circ \text{C}$  auf  $-160^\circ \text{C}$  eine Absorptionszunahme von etwa 20% erwarten lassen. Damit würde sich für diese Probe eine effektive Ausbleichrate von etwa 39% berechnen. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangt man, wenn man das Absorptionsverhältnis von Schulter und Maximum im  $P_r$ -Absorptionsspektrums zugrunde legt. Es beträgt für die Glycerinprobe bei  $-144^\circ \text{C}$  gleich 0,35, für die gefrorene Probe bei  $-160^\circ \text{C}$  ergibt sich ein Wert von 0,56. Da von dem Ausbleichvorgang nur das Maximum und nicht die Schulter bei 615 nm betroffen wird (siehe Abb. 21), errechnet sich aus diesen Werten ein Ausbleichen der Hauptbande um etwa 36%. Der beschriebene, temperaturabhängige Ausbleichvorgang ist völlig reversibel, und es ist unklar, ob er mit Änderungen im Protein, das in der Eismatrix eingebettet ist, oder mit Änderungen der Lichtstreuverhältnisse im Eis zusammenhängt.

Das Absorptionsmaximum von  $P_{fr}$  erfährt im Gegensatz zu  $P_r$  in Eis bei Temperaturerniedrigung kein Bleichen, sondern analog zu den Glycerinproben eine Absorptionszunahme. In Abb. 22 ist

das entsprechende Absorptionsspektrum von  $P_{fr}$  in Kaliumphosphatpuffer bei  $-30^{\circ}\text{C}$  und bei  $-160^{\circ}\text{C}$  wiedergegeben. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Probe, das bei  $-30^{\circ}\text{C}$  bei rund  $725\text{ nm}$  liegt, bei Abkühlung auf  $-160^{\circ}\text{C}$  nach  $735\text{ nm}$ . Diese Verschiebung ist die Folge einer maximalen Absorptionszunahme von  $P_{fr}$  mit sinkender Temperatur nicht im Absorptionsmaximum, sondern bei rund  $740\text{ nm}$  (siehe Differenzspektrum in Abb. 22). Das zweite Maximum bei  $670\text{ nm}$ , das von dem  $P_R$ -Restanteil in der Probe stammt, erfährt dabei keine Verschiebung.

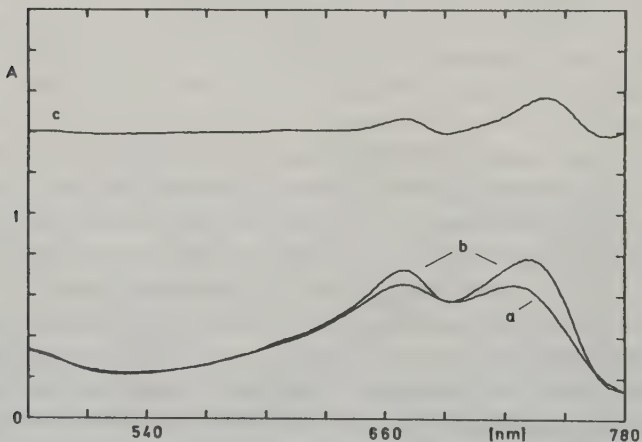


Abb. 22: Absorptionsspektrum von  $P_{fr}$  (120 KD) in gefrorenem 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8; a) bei  $-30^{\circ}\text{C}$ ; b) bei  $-160^{\circ}\text{C}$  und c) Absorptionsdifferenzspektrum b minus a.

Die größere Übereinstimmung des Absorptionsspektrums von 120 KD-Phytochrom in der  $P_{fr}$ -Form bei  $-160^{\circ}\text{C}$  mit dem von 124 KD bei  $4^{\circ}\text{C}$  ( $\lambda_{\text{max}} = 730\text{ nm}$ , Vierstra und Quail, 1983a und b) kann zufällig sein, kann aber auch eine Folge der stärkeren Fixierung des Chromophors durch die tiefe Temperatur im einen Fall und durch das zusätzliche Peptidstück im anderen Fall sein. Das Verschwinden der  $P_{fr}$ -Absorptionsbande bei Temperaturen kleiner  $-35^{\circ}\text{C}$  wurde in Gegenwart von hohen Glycerin- (Burke et al., 1972) oder Glycerin/Ethylglycol-Konzentrationen (Anderson et al., 1969) beobachtet und ist vielleicht ein Dehydratationseffekt (siehe Kap. II.7.3.1.). Im Gegensatz zu Burke et al. (1972) war in eigenen Messungen bei glycerinhaltigen Proben die  $P_{fr}$ -Absorption auch über mehrere Stunden stabil.

Daß bei dem Vergleich von Absorptionsspektren, die bei unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen wurden, große Vorsicht nötig ist, zeigen die Differenzspektren, die in Abb. 23 wiedergegeben sind. Die Differenzspektren 23a und 23b sind einander sehr ähnlich, jedoch ist die Basis für diese beiden Spektren unterschiedlich:

23a gibt die Differenz der Absorption von  $P_r$  bei  $-41$  und bei  $-144^{\circ}\text{C}$  wieder (siehe Abb. 20). Damit liegt der Ursprung dieses Differenzspektrums lediglich in der Verschmälerung ein und derselben Absorptionsbande mit sinkender Temperatur. Dagegen zeigt Abb. 23b die Bildung von Phytochromintermediaten an, die bei der Belichtung von  $P_r$  bei  $-70^{\circ}\text{C}$  entstehen (siehe unten). Es ist daher einleuchtend, daß Spektren, die bei verschiedenen Temperaturen aufgenommen wurden, nur dann im Hinblick auf die bei der Belichtung entstandenen Intermediate interpretiert werden können, wenn die temperaturabhängige Änderung in der Absorption der Probe mit berücksichtigt wird. Dies gilt insbesondere in den Fällen, in denen überhaupt nur Differenzspektren und nicht die zugrundeliegenden Absorptionsspektren zu Verfügung stehen.

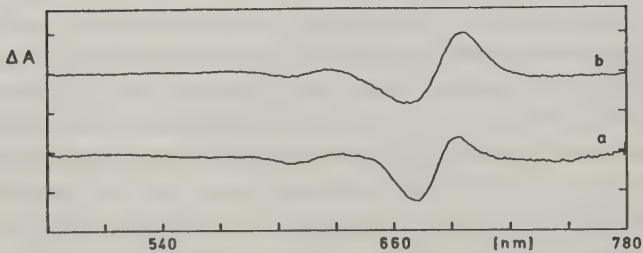


Abb. 23: Absorptionsdifferenzspektren von verschiedenen Phytochromformen; a)  $P_r$  (120 KD) in glycerinhaltigem 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8 (66%, v:v) bei  $-144^\circ \text{C}$  minus bei  $-41^\circ \text{C}$  (siehe Abb. 20); b)  $P_r$  (120 KD) in gefrorenem 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8 bei  $-70^\circ \text{C}$  nach 5 min Rotlichtbestrahlung (660 nm) minus vor Belichtung.

#### 7.2.2. Intermediate auf dem Weg von $P_r$ nach $P_{fr}$

Bei Belichtung von  $P_r$  bei Temperaturen kleiner  $-100^\circ \text{C}$  kann lumi-R, das erste faßbare Intermediat bei der  $P_r$ - $P_{fr}$ -Phototransformation, das mit  $P_r$  im Photogleichgewicht steht (siehe Abb. 19), angehäuft werden. In Abb. 24 ist die HR-Belichtung (15 min bei 660 nm) von  $P_r$  (120 KD) in gefrorenem Kaliumphosphatpuffer bei  $-137^\circ \text{C}$  wiedergegeben. Dabei wird eine kräftige Schulter bei 695 nm ausgebildet, die dem entstandenen lumi-R

zugeordnet werden kann. In Übereinstimmung mit früheren Messungen, die unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt wurden (Eismatrix; Spruit und Kendrick, 1973; Song et al., 1981), führt die Bildung von lumi-R nicht zu einem Ausbleichen im Bereich der maximalen  $P_r$ -Absorption. Kendrick und Spruit (1977) vermuten, daß sich an dieser Stelle die Absorptionzunahme durch die lumi-R Bildung mit der korrespondierenden Absorptionsabnahme als Folge des  $P_r$ -Verlustes gegenseitig aufheben. Zieht man allerdings das oben beschriebene Ausbleichen von  $P_r$  in Eis

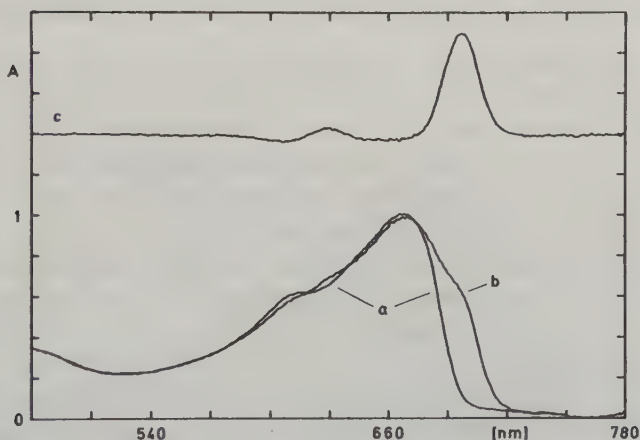


Abb. 24: Absorptionsspektrum von  $P_r$  in gefrorenem 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8; a) bei  $-137^{\circ}\text{C}$ ; b) nach 15 min Rotlichtbestrahlung (660 nm) und c) Absorptionsdifferenzspektrum b minus a

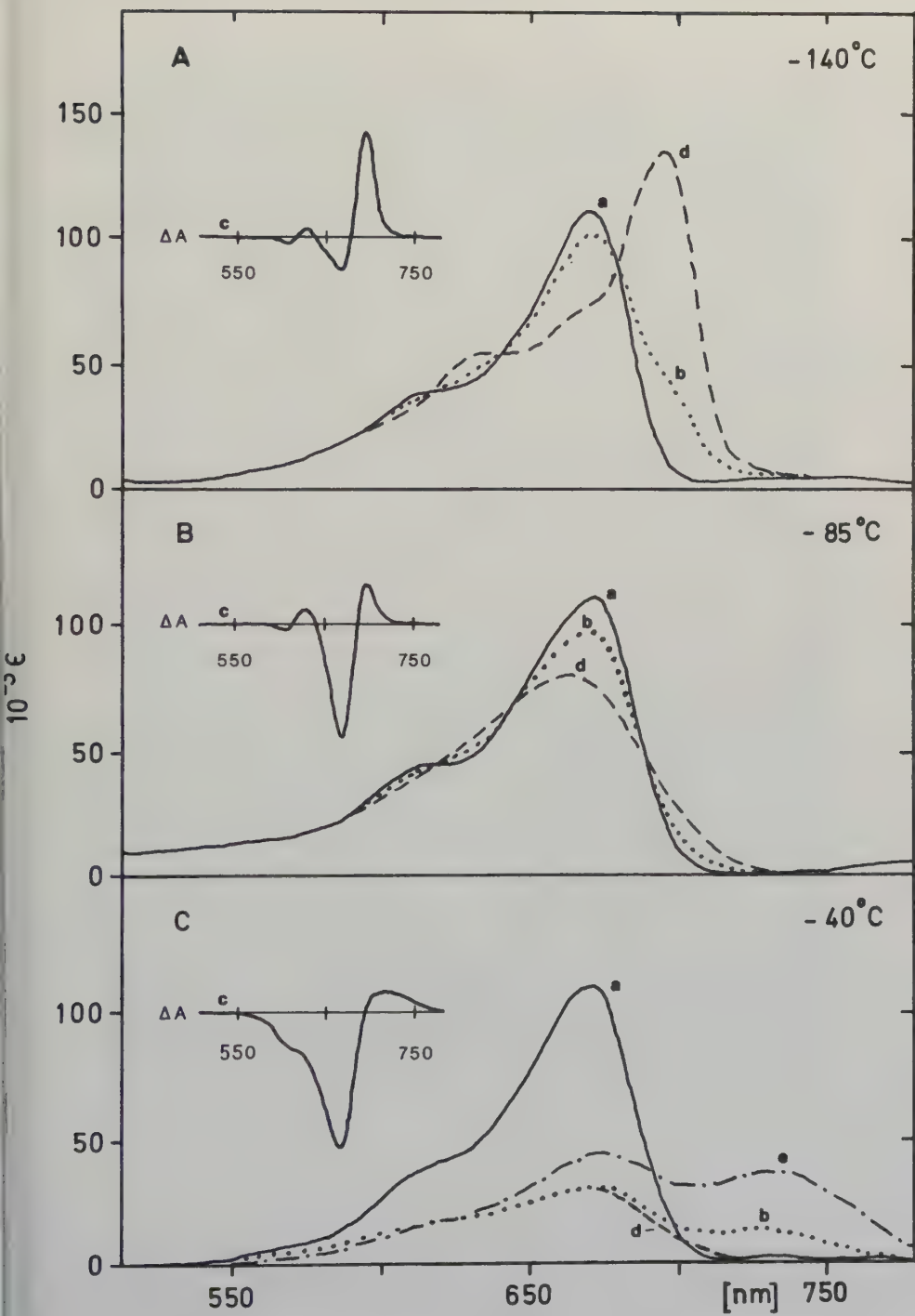
bei niedriger Temperatur mit in Betracht (siehe Abb. 21), so wäre im Differenzspektrum für die Umwandlung von nicht gebleichtem  $P_r$  in lumi-R ein negativer Absorptionswert bei 665 nm zu erwarten. Genau dies ist der Fall, wenn man den gleichen Versuch mit einer Phytochromprobe wiederholt, die in glycerinhaltigem Phosphatpuffer (66%, v:v) gelöst ist.

Abb. 25 zeigt das Absorptionsspektrum von  $P_r$  (120 KD) in glycerinhaltigem Phosphatpuffer (66%, v:v) bei  $-140^{\circ}$  C vor und nach Rotlichtbestrahlung (2 min bei 600 nm) und es wird deutlich, daß die Absorptionzunahme bei 695 nm (30% der ursprünglichen Absorption bei 665 nm), die eine Folge der lumi-R Bildung ist, mit einer Absorptionzunahme bei 665 nm (9%) korres-

---

Abb. 25: Absorptions-, Absorptionsdifferenzspektren und berechnete Absorptionsspektren verschiedener Phytochromformen bei tiefen Temperaturen:

- A) a)  $P_r$  (120 KD) in glycerinhaltigem 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,8 (66%, v:v) bei  $-140^{\circ}$  C; b) nach Rotlichtbestrahlung (2 min bei 600 nm); c) Absorptionsdifferenzspektrum b minus a; d) berechnetes Absorptionsspektrum des reinen Intermediats (lumi-R)
- B) a)  $P_r$  (60 KD) wie unter A bei  $-85^{\circ}$  C b) nach Rotlichtbestrahlung (5 min bei 660 nm); c) Absorptionsdifferenzspektrum b minus a; d) berechnetes Absorptionsspektrum des reinen Intermediats (meta-Ra)
- C) a)  $P_r$  (60 KD) wie unter A bei  $-40^{\circ}$  C; b) nach Rotlichtbestrahlung (15 min bei 660 nm); c) Absorptionsdifferenzspektrum b minus a; d) berechnetes Absorptionsspektrum des reinen Intermediats (meta-Rb); e) b nach Erwärmen auf  $0^{\circ}$  C.



pondiert. Bei Belichtung von  $P_r$  bei Temperaturen größer als  $-100^{\circ}\text{C}$  können weitere, auf lumi-R folgende Intermediate der  $P_r$ -Photokonversion angehäuft werden. In Abb. 25B ist ein Belichtungsversuch von Phytochrom (60 KD) in glycerinhaltigem Phosphatpuffer (66%, v:v) bei  $-85^{\circ}\text{C}$  wiedergegeben. Sie zeigt das Absorptionsspektrum von  $P_r$  vor und nach kurzer HR-Belichtung (5 min bei 660 nm). Wie im Versuch bei  $-140^{\circ}\text{C}$  (Abb. 25 A) kommt es bei  $-85^{\circ}\text{C}$  zu einem lichtinduzierten Ausbleichen im  $P_r$ -Maximum bei 665 nm, jedoch unterbleibt in diesem Versuch die starke Absorptionzunahme bei 695 nm, die bei  $-140^{\circ}\text{C}$  zu beobachten ist. Dieser Versuch bestätigt frühere Experimente von Cross et al. (1969) und von Spruit et al. (1975), die unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt wurden. Nach Kendrick und Spruit (1977; siehe Abb. 19) korrespondiert das Ausbleichen der Bande bei 695 nm mit der Bildung von meta-Ra aus lumi-R. Der Vergleich der Absorptions- und Differenzspektren aus den beiden Belichtungsversuchen (Abb. 25A und B) zeigt, daß lumi-R und meta-Ra bis auf die Bande bei 695 nm sehr ähnliche Absorptionseigenschaften zu besitzen scheinen. Bei Belichtung von  $P_r$  in gefrorenem Phosphatpuffer bei  $-70^{\circ}\text{C}$  sind prinzipiell die gleichen Effekte zu beobachten wie beim entsprechenden Versuch mit der glycerinhaltigen Probe. Allerdings scheint in der Eismatrix die Bildung von meta-Ra etwas behindert zu sein, und nach der HR-Belichtung liegt eine Mischung aus  $P_r$ , lumi-R und meta-Ra vor. Dementsprechend ist im Differenzspektrum aus dem Belichtungsversuch mit der gefrorenen Probe bei  $-70^{\circ}\text{C}$  (Abb. 23.b) die positive Bande bei 695 nm im Vergleich zur negativen Bande bei 665 nm ( $A_{695}/A_{665} = 1,7$ ) größer als im Versuch mit der glycerinhaltigen Probe bei  $-85^{\circ}\text{C}$  ( $A_{695}/A_{665} = 0,3$ ; Abb. 25 B) und kleiner als im Versuch mit der gleichen Probe bei  $-140^{\circ}\text{C}$  ( $A_{695}/A_{665} = 3,0$ ; Abb. 25 A). Meta-Ra ist in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen (Cross et al., 1968; Kendrick und Spruit, 1977; siehe

Abb. 19) photosensibel und kann zu  $P_r$  zurückbelichtet werden und steht damit mit  $P_r$  im Photogleichgewicht. Bei Erwärmen von meta-Ra oder bei Belichtung von  $P_r$  bei Temperaturen größer als  $-70^\circ \text{C}$  tritt ein stark gebleichtes Intermediat immer stärker in den Vordergrund. Es wurde bereits von Cross et al. (1968) und von Burke et al. (1972) spektral näher charakterisiert und als  $P_{bl}$  (= bleached pigment) bezeichnet. Es ist das Folgeprodukt auf meta-Ra und wird deshalb als meta-Rb bezeichnet. Da  $P_{fr}$  erst bei relativ hohen Temperaturen aus meta-Rb gebildet wird, kann meta-Rb durch intensive Bestrahlung bei einer entsprechenden Temperatur in hoher Konzentration angehäuft werden, da es selbst gegenüber Belichtung (im Gegensatz zu lumi-R und meta-Ra) relativ stabil ist. In Abb. 25 C ist die Belichtung von  $P_r$  (60 KD) in glycerinhaltigem Phosphatpuffer (66%, v:v) bei  $-40^\circ \text{C}$  wiedergegeben. Deutlich wird das starke Ausbleichen der langwelligen Absorptionsbande von  $P_r$  bei saturierender HR-Belichtung (15 min bei 660 nm). Die Ausbleichrate in diesem Versuch beträgt etwa 70%. Im Gegensatz zur meta-Ra-Bildung, die im Differenzspektrum gegenüber  $P_r$  die Ausprägung einer negativen Bande zwischen 640 und 690 nm zur Folge hat (Abb. 25 B,c), erfolgt der Ausbleichvorgang bei der meta-Rb-Bildung fast über den ganzen Spektralbereich der langwelligen  $P_r$ -Absorptionsbande von 540 bis 690 nm (Abb. 25 C,c), womit beide Reaktionen an ihren Differenzspektren gegenüber  $P_r$  gut zu unterscheiden sind. Die Schulter bei 730 nm im Spektrum der Abb. 25 C,b zeigt, daß neben meta-Rb bei der Belichtung eine kleine Menge  $P_{fr}$  gebildet wurde (15%; zur  $P_{fr}$ -Konzentrationsbestimmung aus den Absorptionsspektren siehe exp. Teil, Seite 149). Im Gegensatz dazu findet in gefrorenem Phosphatpuffer bei vergleichbaren Temperaturen keine  $P_{fr}$ -Bildung statt (ohne Abbildung), allerdings kann in diesem Fall meta-Rb nicht in so hohen Konzentrationen wie bei dem Versuch mit der glycerinhaltigen Probe angehäuft werden. Korrigiert man das Spektrum der Abb. 25 C,c auf den  $P_{fr}$ -Anteil der Probe (zur

Durchführung siehe exp. Teil, Seite 150), so erhält man das wahrscheinliche Absorptionsspektrum von reinem meta-Rb (Abb. 25 C,d). Es ist aber nicht auszuschließen, daß es noch kleine Absorptionsanteile von meta-Ra oder nicht photokonvertiertem  $P_r$  enthält. Beim Erwärmen von meta-Rb auf  $0^\circ \text{C}$  relaxiert es zu  $P_{fr}$ . Dieser Versuch ist in Abb. 25 C,e wiedergegeben. Er beweist die Dunkelrelaxation von meta-Rb zu  $P_{fr}$  (65%), wobei allerdings auch die Bildung einer größeren Menge von  $P_r$  zu beobachten ist (35%). Die 35%  $P_r$ , die nach dem Erwärmen der Probe bestimmt werden kann, muß sich zum allergrößten Teil aus einer gebleichten Vorstufe gebildet haben, da sich bei einer Korrektur des Spektrums der Abb. 25 C,b auf einen  $P_r$ -Restanteil von 35% ein negativer Absorptionswert bei 665 nm ergeben würde. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Cross et al. (1968) überein.

Die Berechnung der Absorptionsspektren von reinem lumi-R und meta-Ra aus den gemessenen Absorptionsspektren der Abb. 25 A und B erweist sich als wesentlich schwieriger, da die Abschätzung der Konzentration dieser Intermediate nach der Belichtung nicht direkt möglich ist. Das starke Ausbleichen des  $P_r$ -Absorptionsspektrums bei der meta-Rb-Bildung zeigt eine nahezu quantitative Umwandlung von  $P_r$  in das gebleichte Intermediat an, weshalb das für meta-Rb kalkulierte Absorptionsspektrum dem wirklichen meta-Rb-Absorptionsspektrum wohl sehr nahe kommt. Eine Möglichkeit zur Bestimmung der Konzentration der gebildeten Intermediate besteht in deren Relaxierung zu  $P_{fr}$  durch Erwärmen der belichteten Probe, sofern dieser Prozeß quantitativ abläuft. Anhand der Absorptionsdaten von reinem  $P_{fr}$  (siehe Abb. 2 und Tab. 1) kann dann die Menge an gebildetem  $P_{fr}$  aus dem resultierenden Absorptionsspektrum bestimmt werden (siehe exp. Teil, Seite 149).

Schnelles Erwärmen (innerhalb 2 min) der bei  $-140^\circ \text{C}$  belichteten Probe (Abb. 25 A; Bildung von lumi-R) auf  $0^\circ \text{C}$  führt

zur Bildung von 16%  $P_{fr}$ . Ein weiterer Versuch mit längerer Belichtungszeit (10 min bei 660 nm; ohne Abbildung) führt zu einer Absorptionszunahme von 49% bei 695 nm (bezogen auf die ursprüngliche Absorption bei 665 nm) und zu einer Absorptionsabnahme von 17% bei 665 nm. Schnelles Erwärmen dieser Probe ergibt 27%  $P_{fr}$ . Wird die Probe aber nur langsam erwärmt (innerhalb 60 min), werden anstatt 27% nur 10%  $P_{fr}$  gebildet. Dies ist auf eine Dunkelreversion von lumi-R zu  $P_r$  zurückzuführen, die bei der Erwärmung von lumi-R auf über  $-100^{\circ}\text{C}$  zu beobachten ist (Song et al., 1981; Spruit und Kendrick, 1973; Cross et al., 1968; siehe Abb. 19). Deshalb ist die Menge an gebildetem lumi-R sicher höher als die Menge an  $P_{fr}$ , die nach Erwärmung erhalten wird. Eine zusätzliche Möglichkeit zur Bestimmung der Intermediatkonzentration in den Proben bestand in der Heranziehung der Blitzlichtphotolysedaten der  $P_r$ -Photokonversion. Die Absorptions- und Absorptionsdifferenzspektren aus Tieftemperaturexperimenten mit glycerinhaltigen  $P_r$ -Proben zeigen eine sehr gute Übereinstimmung mit denen aus den Blitzlichtphotolyseexperimenten mit  $P_r$  bei  $0 - 4^{\circ}\text{C}$  in glycerinfreiem Puffer. Insbesondere stimmen die aus den Tieftemperaturmessungen bei  $-140^{\circ}\text{C}$  (Abb. 25 A) mit denen aus den Blitzlichtphotolyseexperimenten 10 ns nach dem Lichtblitz überein, die bei  $-85^{\circ}\text{C}$  (Abb. 25 B) gemessenen Spektren mit denen 500  $\mu\text{s}$  nach dem Lichtblitz und die bei  $-40^{\circ}\text{C}$  (Abb. 25 C) mit denen, die 100 - 200 ms nach einem Lichtblitz gemessen wurden (siehe Linschitz et al., 1966; Braslavsky et al., 1980a; Shimazaki et al., 1980, Pratt et al., 1982). Will man Daten aus den Blitzlicht- auf die Tieftemperaturexperimente übertragen, müssen einige Voraussetzungen erfüllt sein:

- a) Die Intermediate mit ähnlichen Spektraleigenschaften müssen in beiden Fällen identisch sein. Dies wurde bisher nie in Frage gestellt (Kendrick und Spruit, 1977; Pratt et al., 1982).

- b) Die in der Einleitung zu diesem Kap. II.7. geschilderten temperaturabhängigen Absorptionsänderungen müssen für  $P_r$  und die Intermediate gleichförmig verlaufen, so daß sich die Absorptionsdifferenzen zwischen  $P_r$  und den entsprechenden Intermediaten nur geringfügig ändern. Dies kann wegen der beschriebenen großen Übereinstimmung der Absorptionsdaten aus den Blitzlicht- und Tieftemperaturexperimenten vorausgesetzt werden.
- c) Die Dunkelrelaxation von lumi-R zu  $P_{fr}$  im Blitzlichtexperiment muß quantitativ sein, so daß die bestimmbare Menge an  $P_{fr}$  und der ursprünglichen Menge an Intermediaten übereinstimmt. Dies wird von Braslavsky et al. (1980a) bestätigt.

Die durch einen Lichtblitz verursachte Absorptionsabnahme bei 665 nm ist über 1 ms stabil (bei Dunkelrelaxation von lumi-R zu meta-Ra ändert sich die Absorption bei 665 nm kaum; z.B. Pratt et al., 1982) und ist nach Punkt c) direkt proportional der durch den Lichtblitz induzierten Menge an  $P_{fr}$ . Linschitz et al. (1966, Fig. 4) fanden eine Absorptionsabnahme von 7% bei 665 nm 0,2 bis 0,5 msec nach dem Lichtblitz, die einer Bildung von etwa 20%  $P_{fr}$  nach der Dunkelrelaxation entsprach. Nach Daten von Pratt et al. (1982) führt eine 14proz. Absorptionsabnahme bei 665 nm zu einer Menge von rund 35%  $P_{fr}$ . Die Absorptionsabnahme von 9% in Abb. 25 A würde dann mit einer Bildung von 23 bis 26% lumi-R korrespondieren. Abb. 25 A,d zeigt das berechnete Spektrum von lumi-R, dem der Wert von 26% Photoumwandlung der Probe zugrunde liegt.

Da, wie oben erwähnt, lumi-R und meta-Ra bei 665 nm offensichtlich gleiche Absorption besitzen, läßt sich aus diesen Daten auch die Menge an meta-Ra im Spektrum der Abb. 25 B,b berechnen. Bei dem Belichtungsversuch bei  $-85^{\circ}\text{C}$  ergibt sich ein Ausbleichen der  $P_r$ -Absorption bei 665 nm von rund 14%. Nach dem für die lumi-R-Berechnung eingesetzten Faktor berechnet sich

dann eine Umwandlung von etwa 40% der ursprünglichen  $P_r$ -Menge in meta-Ra. Dieser Wert liegt dem berechneten Absorptionsspektrum von reinem meta-Ra zugrunde, das in Abb. 25 B,d abgebildet ist.

Die Konfiguration eines Gallenfarbstoffes kann aufgrund der unterschiedlichen spektralen und photochemischen Eigenschaften der E- und Z-isomeren Chromophore in saurem Medium bestimmt werden (siehe Kap. II.3.2.). Bei  $-40^{\circ}\text{C}$  hat die 66proz. Glycerin-Phosphatpuffermischung eine sirupähnliche Konsistenz und kann leicht in der im experimentellen Teil beschriebenen Tief-temperaturmeßapparatur ( Seite 132 ) mit einer 1:1 (v:v) Mischung aus konz. HCl und reinem Glycerin, die bei  $-40^{\circ}\text{C}$  eine ähnliche Konsistenz hat, versetzt werden. Aus diesem Grund ist es möglich, eine meta-Rb-Probe (analog wie in Abb. 25 C,b) bei  $-40^{\circ}\text{C}$ , ähnlich wie die  $P_{fr}$ -Probe bei Raumtemperatur (Abb. 3), mit Säure zu denaturieren. Dieser Versuch ist in Abb. 26 wiedergegeben. Bei Weißlichtbestrahlung der angesäuerten meta-Rb-Probe lassen sich analoge Absorptionsänderungen wie bei der Weißlichtbestrahlung von säuredenaturiertem  $P_{fr}$  beobachten (siehe Abb. 3). Dies beweist, daß der gebleichte meta-Rb-Chromophor bereits ZZE-konfiguriert ist und nach Belichtung im angesäuerten Zustand den ZZZ-konfigurierten  $P_r'$ -Chromophor liefert.

Interessanterweise ist in diesem Fall nach der Rückbelichtung bei rund  $-40^{\circ}\text{C}$  im glycerinhaltigem Puffer die kürzerwelliger absorbierende , gestreckte Chromophor-Form bevorzugt (siehe Kap. II.4.2.). Das hypsochrom verschobene Absorptionsmaximum der Probe nach Rückbelichtung bei  $-40^{\circ}\text{C}$  (Abb. 26 b) gegenüber der entsprechenden Probe bei Raumtemperatur (Abb. 3 b) macht dies deutlich.

Bei tieferen Temperaturen läßt sich dieser Versuch nicht mehr durchführen, da die glycerinhaltigen Puffer dann ein festes Glas bilden.

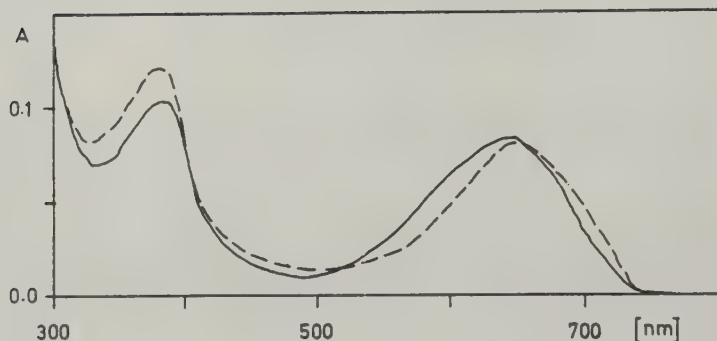


Abb. 26 : Absorptionsspektrum von Phytochrom (60 KD) in glycerinhaltigem Kaliumphosphatpuffer (66%, v:v) pH 7,8 bei  $-40^{\circ}\text{C}$  nach Rotlichtbestrahlung (15 min bei 660 nm; siehe Abb. 25 C,c) und anschließendem Ansäuern mit einem Gemisch aus Glycerin und konz. HCl (1:1, v:v) von  $-40^{\circ}\text{C}$  (—) und nach 10 sec Weißlichtbestrahlung (----)

### 7.2.3. Intermediate auf dem Weg von $P_{fr}$ nach $P_r$

Die Phototransformation von  $P_{fr}$  zu  $P_r$  wurde bislang weniger intensiv untersucht als die Phototransformation von  $P_r$  zu  $P_{fr}$ . Im Blitzlichtexperiment absorbiert das erste faßbare Intermediat (10  $\mu\text{s}$  nach dem Lichtblitz) kürzerwelliger als  $P_r$  mit deutlicher Absorption um 550 nm (Inoue et al., 1982), während Spruit und Kendrick (1977) im Tieftemperaturversuch lumi-F eine Absorption bei 720 nm zuschreiben (Abb. 19). Da diese An-

gabe aber einem Differenzspektrum entnommen wurde, kann das Absorptionsmaximum der zugrundeliegenden Phytochromspezies weit kürzerwelliger liegen und eventuell mit dem weiter unten beschriebenen Tieftemperaturintermediat identisch sein. In Übereinstimmung mit Pratt und Butler (1968) konnte ein Intermediat angehäuft werden, daß ein Absorptionsmaximum bei etwa 670 nm besitzt. Abb. 27 zeigt das Absorptionsspektrum von  $P_{fr}$  in glycerinhaltigem Phosphatpuffer (66%, v:v) bei  $-93^{\circ}C$  (Abb. 27 a) und nach intensiver DR-Belichtung (30 min bei 730 nm; Abb. 27 b). Abb. 27 b zeigt aber nicht das Spektrum des reinen Intermediats. Die Schulter bei 730 nm gibt einen Restanteil an nicht phototransformiertem  $P_{fr}$  wieder. Der Absorption bei 730 nm zufolge entspricht ihr in etwa eine Restmenge von etwa 23%  $P_{fr}$ . Ebenso enthält das gemessene Spektrum einen Restanteil von 20%  $P_r$ , der a priori im  $P_{fr}$ -Spektrum in Abb. 27 a enthalten ist (Butler et al., 1964) und bei der DR-Belichtung nicht verändert wird. Durch die Korrektur des Spektrums der Abb. 27 b auf die Restmengen an  $P_r$  und  $P_{fr}$  erhält man das Spektrum des reinen Intermediats, das in Abb. 27 c wiedergegeben ist. Gegenüber  $P_r$  (bei gleicher Temperatur, Abb. 27 d) ist die entstandene Phytochromspezies deutlich gebleicht und besitzt im Längerwelligen eine breitere Absorptionsbande. Das beschriebene Intermediat ist wahrscheinlich mit dem Tieftemperaturintermediat identisch, das Pratt und Butler (1968) "FR'" und Burke et al. (1972) als "A" bezeichneten, da diese unter ähnlichen Versuchsbedingungen erhalten wurden. Von den von Kendrick und Spruit (1977) beschriebenen Intermediaten der  $P_{fr}$ -Photokonversion (siehe Abb. 19) besteht wohl mit meta-Fb die größte Übereinstimmung. Erwärmen der belichteten Probe auf  $0^{\circ}C$  führt zu der Bildung von  $P_r$  und einer zusätzlichen kleinen Menge  $P_{fr}$ . Gegenüber den 23% Anteil von  $P_{fr}$  nach der Belichtung bei  $-93^{\circ}C$  wird nach dem Erwärmen ein Anteil von 28% bestimmt. Dies bedeutet

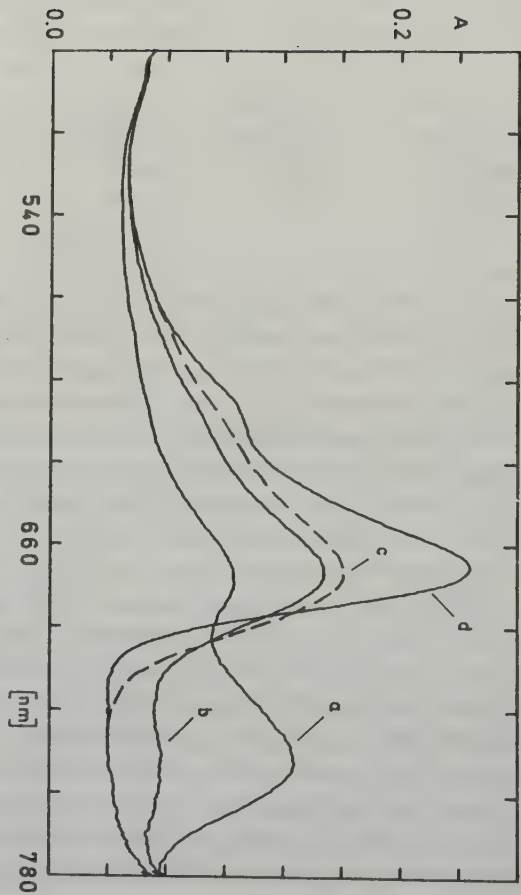


Abb. 27: a) Absorptionsspektrum von  $P_{Ir}$  (120 KD) in glycerinhaltigem 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8 (66%, v:v) bei  $-93^{\circ}\text{C}$  und b) nach Dunkelrotbestrahlung (30 min bei 730 nm); c) Berechnetes Absorptionsspektrum des reinen Intermediats (meta-Fb); d)  $P_{Ir}$  (120 KD) wie unter a.

eine Dunkelreversion von etwa 5% des gesamten Phytochrom zu  $P_{fr}$ , das einer Dunkelreversion von rund 9% des gebildeten Intermediates zu  $P_{fr}$  entspricht (unter Berücksichtigung der Anteile von 20%  $P_r$  und 23%  $P_{fr}$  in der belichteten Probe bei  $-93^{\circ}\text{C}$  entstanden durch die Belichtung 57% meta-Fb). Dunkelreversion zu  $P_{fr}$  wurde auch im Blitzlichtexperiment bei der Phototransformation von  $P_{fr}$  nach  $P_r$  beobachtet (Inoue et al., 1982). In Übereinstimmung mit Pratt und Butler (1968) kann meta-Fb durch HR-Belichtung zu  $P_{fr}$  revertiert werden.

Bei Belichtung von  $P_{fr}$  in glycerinhaltigem (66%, v:v) Phosphatpuffer bei  $-40^{\circ}\text{C}$  erhält man eine Phytochromspezies, die gegenüber  $P_r$  ein kaum verändertes Absorptionsspektrum besitzt (ohne Abb.). Gegenüber dem  $P_r$ -Spektrum ist es nur um einige nm hypsochrom verschoben, leicht gebleicht und entspricht damit in etwa dem Absorptionsspektrum von  $P_r$  in 5M Harnstoff (Butler et al., 1964 a; siehe Kap. 7.II.7.3.2.), bei dem die Chromophor-Proteinwechselwirkungen offensichtlich leicht gesört sind.

#### 7.2.4. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Tieftemperaturmessungen

Die gesammelten Daten erlauben eine erste, annähernde Berechnung der Absorptionsspektren einzelner Intermediate der Photokonversion des Phytochroms (Abb. 25 und 27) (zur Durchführung der Berechnungen siehe experimenteller Teil, Seite 149). Die molaren Extinktionskoeffizienten dieser Intermediate sind in Tabelle 11 zusammengefaßt. Der Vergleich der berechneten Spektren mit denen des  $P_r$  und  $P_{fr}$  läßt folgende Schlußfolgerungen zu: Der berechnete Wert der molaren Absorption von lumi-R bei 665 nm ist dem des "gebleichten"  $P_r$  bei niedriger Temperatur bei gleicher Wellenlänge sehr ähnlich. Dies stimmt mit der Beobachtung überein, daß keine nennenswerte Absorptionsänderung bei 665 nm

stattfindet, wenn "gebleichtes"  $P_r$  zu lumi-R photokonvertiert wird (siehe Abb. 24)

Tab. 11: Spektraldaten der Phytochromintermediate

| Phytochrom-<br>spezies | Lösungsmittel     | T (° C) | $\lambda$ (nm)   | $\epsilon^a \times 10^{-3}$ |
|------------------------|-------------------|---------|------------------|-----------------------------|
| lumi-R                 | b                 | +140    | 695 <sup>c</sup> | 132                         |
| lumi-R                 | b                 | -140    | 665              | 71                          |
| meta-Ra                | b                 | - 85    | 655 <sup>c</sup> | 76                          |
| meta-Rb                | b                 | - 40    | 665 <sup>c</sup> | 31                          |
| meta-Fb                | b                 | - 93    | 670 <sup>c</sup> | 70                          |
| $P_r$ (gebleicht)      | 10 mM KPP/pH 7,8  | -160    | 665 <sup>c</sup> | 70                          |
| $P_{fr}$               | 100 mM KPP/pH 7,8 | 0       | 665              | 28 <sup>d</sup>             |

- a) Die  $\epsilon$ -Werte sind alle auf das zugrundeliegende  $P_r$ -Absorptionsspektrum bezogen (siehe Abb. 25 und 27), ohne Berücksichtigung der temperaturabhängigen Absorptionsänderungen des  $P_r$ -Spektrums (siehe Abb. 20 mit,  $\epsilon_{665}^{P_r} = 110\,000$  (Brandlmeier et al., 1981a)), damit der Vergleich der molaren Extinktionen der einzelnen Intermediate untereinander möglich ist.
- b) 66 Vol.% Glycerin in 10 mM KPP/pH 7,8
- c) Absorptionsmaximum
- d) entnommen aus Abb. 2c

Der molare Extinktionskoeffizient von lumi-R bei 695 nm ist wahrscheinlich etwas größer als der des  $P_r$  bei 665 nm. Auffällig ist, daß die Form des Absorptionsspektrums von lumi-R im sichtbaren Spektralbereich dem des  $P_r$  sehr ähnlich ist, nur daß es gegenüber diesem um etwa 25 nm bathochrom verschoben ist und etwas größere Absorptionswerte zu besitzen scheint. Das Auf-

treten mehrerer Intermediate (meta-Ra, meta-Rb, meta-Fb), die alle wie das  $P_r$  ein Absorptionsmaximum um 665 nm besitzen, kompliziert genauere spektrale und kinetische Analysen. Abb. 25 und 27 machen deutlich, daß meta-Ra und meta-Fb sehr ähnliche Absorptionsspektren besitzen (obwohl sie höchstwahrscheinlich verschieden konfigurierte Chromophore besitzen: meta-Ra wahrscheinlich ZZE und meta-Fb wahrscheinlich ZZZ). Weiterhin zeigt Tab. 11, daß  $P_{fr}$  und meta-Rb bei 665 nm in etwa die gleiche Absorption besitzen. Dies stimmt mit Beobachtungen aus den Blitzlichtphotolyseexperimenten überein. Demnach kann 1 bis 2 s nach dem Lichtblitz eine weitere Absorptionszunahme bei 730 nm gemessen werden, wobei bei 665 nm kaum noch Absorptionsänderungen feststellbar sind (Linschitz et al., 1966; Pratt et al., 1982). Genau dies ist auch nach den in Tabelle 11 gegebenen Daten bei der meta-Rb Dunkelrelaxation zu  $P_{fr}$  zu erwarten. Die Möglichkeit 2 bis 3 paralleler Wege der Photokonversion von  $P_r$  nach  $P_{fr}$  ist bereits mehrfach diskutiert worden (z.B. Linschitz et al., 1966; Cordonnier et al., 1981; Pratt et al., 1982). Deshalb muß auch damit gerechnet werden, daß die berechneten Spektren die Absorptionsanteile aller Intermediate beinhalten, die sich möglicherweise parallel bilden. Jedoch schreiben Pratt et al. (1982) den parallel gebildeten Intermediaten nur unterschiedliches kinetisches Verhalten und nicht unterschiedliches spektrales Verhalten zu (z.B. zwei Sorten von lumi-R, die als  $I_{700}^1$  und  $I_{700}^2$  bezeichnet werden). Von den beschriebenen Intermediaten kann nur dem meta-Rb eine eindeutige Chromophorkonfiguration zugeordnet werden. Der Säuredenaturierungsversuch (Abb. 26) beweist, daß der meta-Rb-Chromophor E-konfiguriert ist. Eine experimentelle Grundlage, den anderen Intermediaten eine bestimmte Chromophorkonfiguration zuzuordnen, gibt es bislang noch nicht.

### 7.3. Chemisch gebleichte Phytochromchromophore

Wie oben geschildert, treten bei der Phototransformation des Phytochroms stark gebleichte Spezies auf, die besonders unter Pigmentcyclings-Bedingungen in größeren Mengen angehäuft werden (Briggs und Fork, 1969). Im Tieftemperaturexperiment kann auf dem Weg von  $P_r$  nach  $P_{fr}$  um  $-40^{\circ} \text{C}$  eine stark gebleichte Phytochromspezies (meta-Rb) angehäuft werden, die bereits den ZZE-konfigurierten Chromophor trägt (siehe oben). Es war bekannt, daß die Phototransformation des Phytochroms unter denaturierenden Bedingungen (siehe unten) auch bei Raumtemperatur nicht vollständig abläuft bzw. ganz unterbunden wird und dabei gebleichte Phytochromspezies angehäuft werden. Es war deshalb interessant, die Konfiguration dieser Chromophore ebenfalls zu prüfen. Wie im Falle des meta-Rb geschah dies in allen Versuchen nach Ansäuern der gebleichten Phytochromproben anhand der charakteristischen spektralen und photochemischen Eigenschaften der ZZE-konfigurierten Gallenfarbstoffkationen, die in Kap. II.3.2. ausführlich beschrieben sind.

#### 7.3.1. Reversibles Ausbleichen der Phytochromchromophore

Reversibles Ausbleichen von  $P_r$  und  $P_{fr}$  kann durch vollständiges Entfernen von Wasser erzielt werden. Dies kann erreicht werden durch Gefriertrocknen einer Phytochromlösung, die entweder Glycerin (Balange, 1974) oder Gelatine (Tobin et al., 1973) enthält. Ähnliche Resultate können durch Gefriertrocknung von Phytochromlösungen ohne Glycerin- oder Gelatinezusatz erzielt werden, jedoch ist es schwieriger, von dem getrockneten "Phytochrompulver" Absorptionsspektren aufzunehmen. Die Absorptionsspektren von dehydratisiertem  $P_r$  und  $P_{fr}$  sind einander sehr ähnlich und entsprechen in etwa den Absorptionsspektren von SDS-

denaturiertem  $P_r$  und  $P_{fr}$  (siehe unten, Abb. 29). Sie absorbieren etwas kürzerwelliger als  $P_r$  und meta-Rb und besitzen um 550 nm deutliche Absorption. Sie zeigen damit ähnliche Absorptionseigenschaften wie das von Inoue et al. (1982) beschriebene frühe Blitzlichtintermediat der  $P_{fr}$ -Phototransformation, und es könnte durchaus eine "Verwandtschaft" zwischen beiden Chromophorspezies bestehen. In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen (Tobin et al., 1973; Balangé, 1974) zeigt dehydriertes Phytochrom keine photoreversiblen Absorptionsänderungen. Diese können nach Rehydrierung der Phytochromproben wieder beobachtet werden. Obwohl die Absorptionsspektren von dehydriertem  $P_r$  und  $P_{fr}$  kaum zu unterscheiden sind, besitzen sie zwei verschiedene Chromophore. Zugabe von Wasser zu dehydriertem  $P_{fr}$  ergibt  $P_{fr}$  (ähnlich wie das Erwärmen von meta-Rb; Abb. 25C), Zugabe von Wasser zu dehydriertem  $P_r$  ergibt  $P_r$ . Daß der Unterschied zwischen dehydriertem  $P_r$  und  $P_{fr}$  in

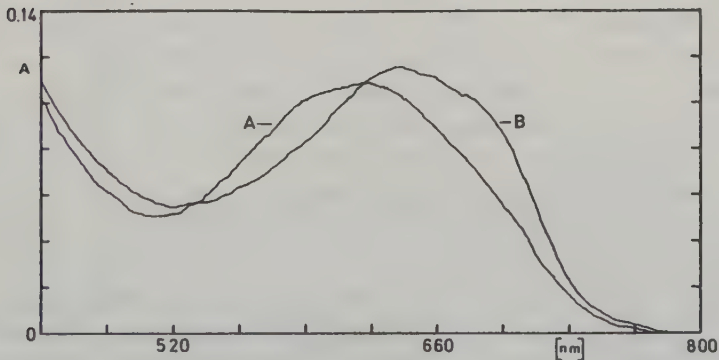


Abb. 28: A) Absorptionsspektrum von  $P_{fr}$  (120 KD) in wasserfreiem Glycerin (nach Gefriertrocknung) nach Ansäuern mit konz. Ameisensäure (Endkonzentration = 5%, v:v) und B) nach 10 sec Weißlichtbestrahlung

der Konfiguration der Chromophore besteht, zeigt der Versuch, der in Abb. 28 wiedergegeben ist. Ansäuern von  $P_{fr}$  in 100% Glycerin mit wasserfreier Ameisensäure ergibt das ZZE-konfigurierte  $P_{fr}'$ -Chromophorkation, das bei Belichtung zum  $P_r'$ -Chromophor-Kation revertiert.

### 7.3.2. Irreversibles Ausbleichen der Phytochromchromophore

Behandlung von  $P_{fr}$  mit SDS führt zu einer irreversibel gebleichten Form (Abb. 29A), die gegenüber SDS-denaturiertem  $P_r$  (Abb. 30A) nur ein gering verändertes Absorptionsspektrum besitzt. Die ZZE-Konfiguration des Chromophors des SDS-denaturiertem  $P_{fr}$  kann durch Ansäuern und anschließender Belichtung der Probe gezeigt werden (Abb. 29). Ansäuern von SDS-behandeltem  $P_r$  führt direkt zum Absorptionsspektrum vom ZZZ-Chromophor-Kation, das gegenüber Belichtung stabil ist (Abb. 30B). Wie im Versuch in glycerinhaltigem Phosphatpuffer (66%, v:v) bei  $-40^{\circ}\text{C}$  (Abb. 26), nimmt das ZZZ-konfigurierte Chromophorkation in SDS-behandeltem Phytochrom bevorzugt die offenere, kürzerwelliger absorbierende Konformation ein (Braslavsky et al., 1983; siehe Kap. II.4.2.) angezeigt durch die kürzerwelligere Absorption des SDS-Denaturierungsproduktes im Vergleich zum  $P_r'$ -Chromopeptid in 1proz. wässriger Ameisensäure (Abb. 6) oder harnstoffdenaturiertem  $P_r'$  bei niedrigem pH (Abb. 34c).

Irreversibles Bleichen von  $P_{fr}$  kann unter einer Vieszahl von Bedingungen erfolgen, unter denen  $P_r$  nicht denaturiert wird und sich dessen Absorption nur unbedeutend verändert. Die Belichtung von  $P_r$  unter diesen Bedingungen führt ohne erkennbare Bildung von  $P_{fr}$  direkt zu der gebleichten Phytochromform.

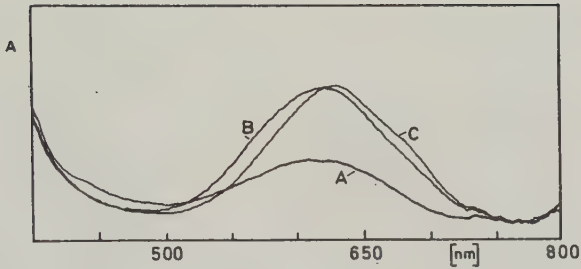


Abb. 29: A) Absorptionsspektrum von  $P_{fr}$  (120 KD) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8 in Gegenwart von 2% SDS;  
B) Nach Ansäuern mit konz. Ameisensäure (Endkonzentration = 5%, v:v)  
C) nach 10 sec Weißlichtbestrahlung

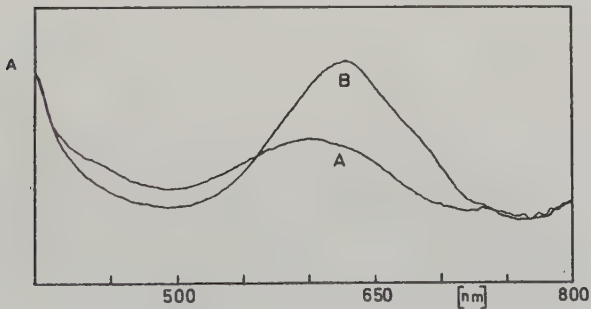


Abb. 30: A) Absorptionsspektrum von  $P_r$  (120 KD) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8 in Gegenwart von 2% SDS  
B) nach Ansäuern mit konz. Ameisensäure (Endkonzentration = 5%, v:v)

Dies ist der Fall für teilweise Denaturierung mit 4M Harnstoff (Butler et al., 1964a), partielle Proteolyse (Yamamoto und Fu-

ruya, 1983), weiterhin für teilweise Dehydratisierung des Proteins mit Methanol, Aceton oder Ethylenglycol (ohne Abb.) und die Bindung von 8-Anilinonaphtalen-1-Sulfonat (ANS; Hahn und Song, 1981) an Phytochrom. In jedem Fall kann die ZZE-Konfiguration des im Dunklein gebleichten  $P_{fr}$ -Chromophors bzw. des

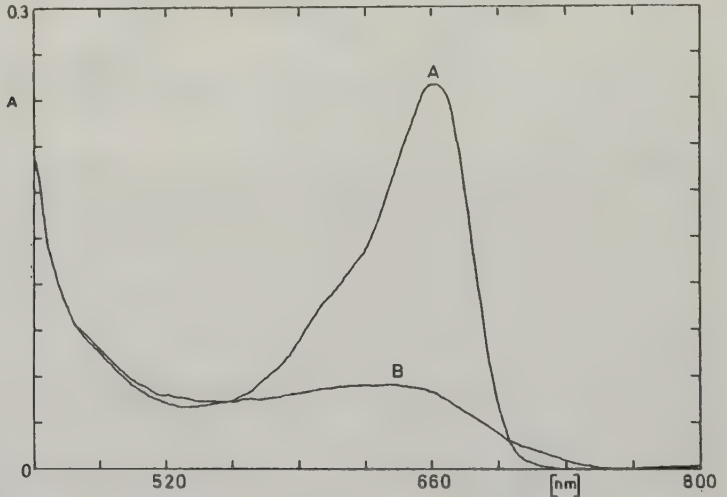


Abb. 31: A) Absorptionsspektrum von  $P_r$  (120 KD) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,8 in Gegenwart von 10 mM ANS; B) nach Rotlichtbestrahlung (30 sec bei 660 nm)

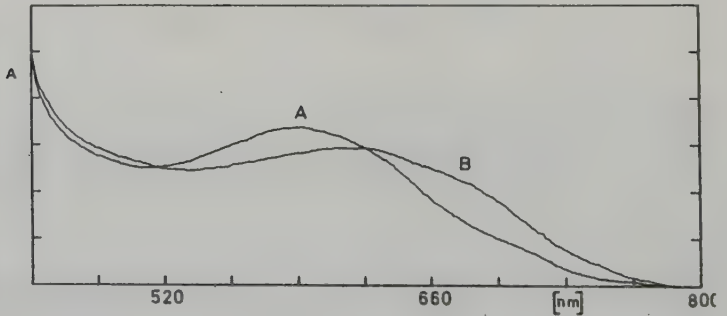


Abb. 32: Probe B der Abb. 31 nach Ansäuern mit konz. Ameisensäure (Endkonzentration 5%, v:v) (A); B) nach 10 sec Weißlichtbestrahlung

in Gegenwart der denaturierenden Reagentien durch Belichtung gebleichten  $P_r$ -Chromophors durch Ansäuern und anschließende Belichtung der Probe gezeigt werden. Dies ist für die ANS-Behandlung in Abb. 31 und 32 wiedergegeben. Phytochrom besitzt gegenüber Tetranitromethan eine analoge Reaktivität wie z.B. gegenüber ANS (Hunt und Pratt, 1981). Bei Behandlung mit Tetranitromethan wird der  $P_{fr}$ -Chromophor allerdings chemisch zerstört, und nach Ansäuern kommt es nicht zu der typischen Absorption des  $P_{fr}'$ -Kation. Ein Versuch mit PC-Chromopeptid zeigt, daß in Gegenwart von Tetranitromethan aus vorher blau gefärbten Galtenfarbstoffen ein gelbliches Reaktionsprodukt entsteht (ohne Abb.). Die partielle Denaturierung von  $P_r$  wurde auch mit Hilfe der CD-Spektroskopie verfolgt (Abb. 33 und 34), da das Bleichen des Chromophors bei Belichtung mit größeren Konformationsänderungen verbunden sein sollte. Das CD-Spektrum von  $P_r$  bei pH 7,7 ändert sich nicht signifikant bei der Zugabe von Harnstoff in einer Endkonzentration von 4 M (Abb. 33). Die kleinen Änderungen in der langwelligen CD-Bande entsprechen den kleinen Änderungen in den Absorptionsspektren unter den gegebenen Bedingungen (ohne Abb.). Dies zeigt, daß 4 M Harnstoff nicht ausreichen, um eine Denaturierung von  $P_r$  zu bewirken. In Übereinstimmung mit Butler et al. (1964a) führt Belichtung der Probe bei 660 nm zu einem drastischen Ausbleichen der langwelligen Absorptionsbande (rund 80%), ohne korrespondierendes Erscheinen der  $P_{fr}$ -Absorptionsbande bei 730 nm. Trotzdem läßt sich ein kleiner Teil durch Belichtung bei 730 nm wieder zu  $P_r$  revertieren (rund 10%). Bei mehrmaliger Belichtung bei 660 und 730 nm geht auch diese restliche Photoreversibilität verloren, und es resultiert eine stark gebleichte Lösung mit schwacher, breiter Absorption um 600 bis 650 nm (Abb. 34 a).

Die gebleichte Phytochromspezies besitzt im ganzen Spektralbereich (250 bis 800 nm) sehr schwache CD-Signale (Abb. 33c), die an die schwachen LICD-Signale des ZZE-OEBV erinnern (Abb. 14) und implizieren damit auch die ZZE-Konformation des ge-

bleichten Chromophors.

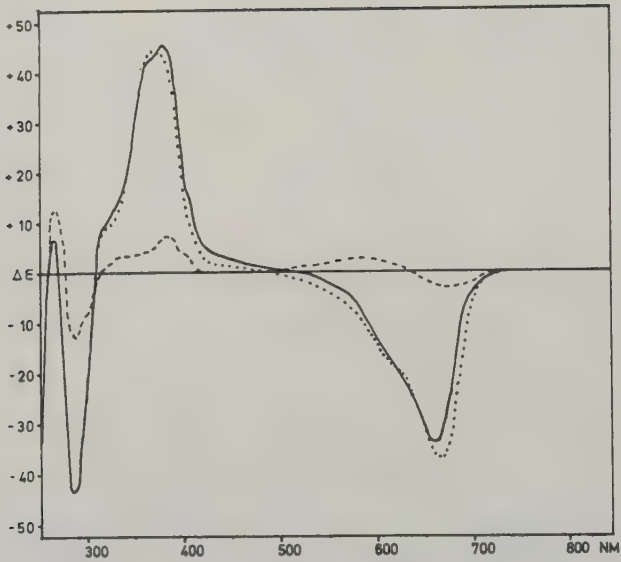


Abb. 33: a) CD-Spektrum von  $P_r$  (120 KD) in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,7 (—) und b) nach Zugabe von Harnstoff (Endkonzentration = 4,3 M) (.....); c) Probe b nach wiederholter Belichtung bei 660 nm und 730 nm (-----)

Das relativ große CD-Signal vom ZZE-konfigurierten meta-Rb bei  $-45^{\circ}\text{C}$  (Burke et al., 1972) könnte ein Temperatureffekt sein. Lehner et al. (1981) fanden eine starke positive Temperaturabhängigkeit der LICD-Signale bei sinkender Temperatur. Andererseits ist aber auch eine größere Protein-Chromophorwechselwirkung im Tieftemperaturintermediat denkbar, da auch für das von Yamamoto und Furuya (1983) beschriebene " $P_{bl}$ " ein ähnlich deutlicher CD bei Raumtemperatur gemessen wurde. Es entsteht bei

Belichtung eines 55 KD-Bruchstückes von  $P_r$ . Der S-förmige Verlauf des CD-Spektrums (Abb. 32 c) im langwelligen Spektralbereich deutet auf eine Uneinheitlichkeit der Probe hin. Die ZZE-Konfiguration des gebleichten Chromophors kann durch anschließendes Ansäuern und Belichten der Probe UV-Vis-spektroskopisch nachgewiesen werden (Abb. 34 b, c). Das nach dem Ansäuern gemessene CD-Spektrum (Abb. 34 d) stimmt bis auf die beiden scharfen CD-Signale bei 420 und 440 nm gut mit dem von Brandlmeier et al. (1981b) gemessenen CD-Spektrum von  $P_{fr}$  nach saurer Denaturierung in Gegenwart von Harnstoff (Endkonzentration gleich 8 M) überein. Bei der lichtinduzierten Reversion des ZZE-Chromophors zu der ZZZ-Komponente verschwinden die beiden CD-Signale bei 420 und 440 nm (Abb. 34 a), und die gleichzeitig auftretende bathochrome Absorptionsverschiebung im roten Spektralbereich ist auch im CD-Spektrum zu beobachten. Dabei tritt eine Zunahme der Elliptizität in der langwelligen CD-Bande auf (etwa um den Faktor 2 unter Berücksichtigung eines kleinen Anteils an ZZZ-konfigurierten Chromophor bereits vor der Belichtung). Brandlmeier et al. (1981b) beobachteten eine harnstoffinduzierte Zunahme der Elliptizität im CD-Spektrum vom  $P_r'$ -Chromopeptid. Dies ist auch der Grund für die hohe Elliptizität der CD-Banden des harnstoffdenaturierten  $P_r$  in saurer Lösung, die im roten Spektralbereich der des intakten Phytochroms entspricht. Gegenüber dem ZZZ-Chromophor ist im ZZE-Chromophor die harnstoffinduzierte Zunahme der Elliptizität geringer. Dies könnte auch in diesem Fall ein Hinweis auf eine stärker planare Konformation des ZZE- gegenüber den ZZZ-konfigurierten Chromophoren bedeuten, wie dies am Beispiel des E- und Z-konfigurierten OEBV (12, 14) in L-(-)-Ethyllactat besonders deutlich wurde (siehe Kap. II.4.1. Tab. 6). Zum Vergleich sind die CD-Daten des Reaktionszyklus von  $P_r$  in 4 M Harnstoff in Tab. 12 zusammengestellt.  $P_{fr}'$ - und  $P_r'$ -Chromopeptid besitzt in 50% Essigsäure (Abb. 11) gegenüber harnstoffdenaturiertem Phytochrom eine bis zu fünffach reduzierte Elliptizität. Im Gegen-

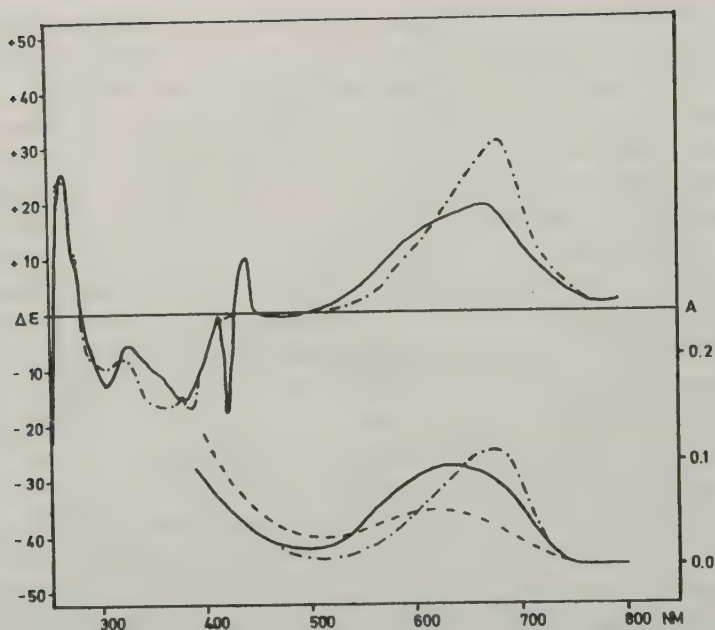


Abb. 34: (unten): a) Absorptionsspektrum der Probe c der Abb. 33 (----); b) nach Ansäuern mit konz. HCl auf pH 1,5 im Dunklen (—); c) nach 10 sec Weißlichtbestrahlung (-.-.-); (mitte) d) CD-Spektrum der Probe 33c nach Ansäuern mit konz. HCl auf pH 1,5 (—); e) nach 10 sec Weißlichtbestrahlung (-.-.-)

satz zu letzterem besitzen aber die beiden Chromopeptidspezies ( $P_r'$  und  $P_{fr}'$ ) in etwa gleich große  $\Delta\epsilon$ -Werte. Der starke Einfluß des Harnstoffes auf die Elliptizität der CD-Signale der Phytochromchromophore (die Absorptionsspektren werden dagegen

gering beeinflußt) deutet auf intramolekulare Wasserstoffbrücken in den Chromophoren hin (eventuell auch mit der gebundenen Peptidkette), die durch das Chaotrop Harnstoff aufgehoben werden. Außerdem scheint in harnstoffhaltigem Puffer das ZZZ-konfigurierte  $P_r'$ -Kation bevorzugt in der stärker cyclischen Konformation vorzuliegen. Dies zeigt die, z.B. gegenüber SDS-denaturiertem  $P_r$  (siehe oben, Abb. 30 B) bathochrom verschobene, schmale Absorptionsbande vom  $P_r'$ -Kation in 4 M Harnstoff im sichtbaren Spektralbereich (Abb. 34 c). Das positive CD-Signal bei 440 nm im harnstoffdenaturiertem  $P_{fr}'$ -Chromophorkation (Abb. 34 d) ist schwächer auch beim  $P_{fr}'$ -Chromopeptid in 50proz. wässriger Ameisensäure zu beobachten (Abb. 11). Der Ursprung dieses Signals ist sehr schwer zu erklären, da der  $P_{fr}'$ -Chromophor an dieser Stelle nur minimale Absorption besitzt (z.B. Abb. 6). Möglich wäre eine Wechselwirkung einer nucleophilen Gruppe aus der Peptidkette mit der C-10-Methinbrücke des Chromophors, wie sie bei Falk et al. (1980) beschrieben ist. Das entstehende Bilirubinderivat absorbiert in diesem Spektralbereich maximal, und Wagnière und Blauer (1976) fanden bei, an Protein absorbierten Bilirubin die stärksten für Gallenfarbstoffe bekannten CD-Signale. Diese könnten dann selbst in geringen Konzentrationen einen beträchtlichen Beitrag im CD-Spektrum leisten. Einem solchen Chromophor schreiben Holzwarth et al. (1982) auch die "anormale" Fluoreszenz des Phytochroms zu. Ein Kandidat für die nucleophile Gruppe ist das Histidin, das in der Peptidkette des Phytochromchromopeptids enthalten ist (Lagarias und Rapoport, 1980) und, an Sepharose immobilisiert, mit PC-Chromopeptiden Wechselwirkungen eingeht (Rabier et al., 1983). In Übereinstimmung damit sind auch im NMR (siehe Kap. II.5.2.3.) deutliche Verschiebungen der Histidinsignale bei der Phototransformation des  $P_{fr}$ -Chromopeptids zu erkennen.

Tab. 12: CD-Daten von nativen und harnstoffdenaturiertem  
Phytochrom<sup>a</sup>

| No. | Probe,<br>Lösungsmittel                                       | $\lambda_{\max}$ (nm)<br>Absorption | CD (nm)                                    | $\Delta\epsilon_{\max}$<br>(M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ) |
|-----|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|
| 1.  | P <sub>r</sub> , 0,1 M Phosphat-<br>puffer, pH 7,7            | 665                                 | 665<br>368<br>286<br>264                   | -38,2<br>+45,0<br>-45,0<br>+ 6,4                               |
| 2.  | No. 1 plus 4,3 M<br>Harnstoff                                 | 660                                 | 660<br>379<br>286<br>264                   | -35,0<br>+45,7<br>-45,0<br>+ 6,4                               |
| 3.  | No. 2 nach wieder-<br>holter Belichtung<br>bei 660 und 730 nm | 625                                 | 676<br>580<br>385<br>286<br>264            | - 3,2<br>+ 2,9<br>+ 7,1<br>-13,6<br>+12,9                      |
| 4.  | No. 3 angesäuert<br>mit HCl auf pH 1,5<br>im Dunklen          | 685 (s)<br>628                      | 671<br>608 (s)<br>440<br>420<br>380<br>305 | +19,3<br>+15,7<br>+10,6<br>-18,2<br>-15,7<br>- 6,1             |
| 5.  | No. 4 nach Weiß-<br>lichtbestrahlung                          | 675                                 | 682<br>385<br>360<br>305<br>264            | +31,1<br>-17,1<br>-17,1<br>-10,4<br>+24,6                      |

a) Die CD-Spektren wurden bei 10° C aufgenommen

#### 7.4 Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen der Tieftemperatur- messungen und den Versuchen mit gebleichtem Phytochrom

Burke et al. (1972) schließen aus dem kleinen  $Q_{\text{Vis}}^{\text{UV}}$ -Wert und der geringen Absorption von meta-Rb, daß in meta-Rb der Chromophor vom Protein relativ unbeeinflusst ist. Damit besitzt er die Absorptionseigenschaften der freien Gallenfarbstoffe, die

eine zyklische Konformation einnehmen (Kap. II.1.2.). Gleiches gilt dann auch für die chemisch gebleichten Chromophore. Diese Annahme wird beim Vergleich der Extinktionskoeffizienten der gebleichten Phytochromproben bestätigt, die in Tabelle 13 aufgelistet sind. Es wird deutlich, daß die molare Extinktion der gebleichten Phytochromchromophore mehr oder weniger von der "Art" des Bleichens unabhängig ist und in etwa der des PC-Chromopeptids in neutraler Lösung entspricht (Tab. 13). Der vergleichsweise höhere Extinktionskoeffizient des meta-Rb (s. Tab. 11) ist eventuell ein Hinweis auf restliche Protein-Chromophorwechselwirkungen, oder auf die Gegenwart einer kleinen Menge an nicht photokonvertiertem  $P_r$ , oder Reste von meta-Ra in der Probe. Neben ähnlichen spektralen Eigenschaften besitzen die gebleichten Phytochromchromophore auch ähnliche photochemische Eigenschaften wie die Bilipeptide (Kap. II.3.2.), speziell

Tab. 13: Spektraldaten gebleichter Phytochromformen (120 KD) bei neutralem pH

| Substanz                   | Lösungsmittel                            | $\lambda_{\max}$ (nm) | $\epsilon^a \times 10^{-3}$ |
|----------------------------|------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| $P_{fr}$                   | reines Glycerin                          | 630                   | 24,0                        |
| $P_{fr}$ nach Trypsinabbau | 10mM Tris/pH 7,8                         | 650                   | 22,0                        |
| $P_{fr}$                   | 5M Harnstoff in<br>0,1M KPP/pH 7,7       | 630                   | 21,0                        |
| $P_{fr}$                   | 10mM ANS in<br>0,1M KPP/pH 7,8           | 640                   | 18,0                        |
| $P_{fr}$                   | 25vol.% Ethylen-<br>glycol in KPP/pH 7,8 | 650                   | 17,0                        |
| $P_r$                      | 2% SDS in 0,1M<br>KPP/pH 7,8             | 605                   | 14,5                        |
| PC-Chromopeptid (ZZZ)      | 0,1 M Tris/pH 8,0                        | 580                   | 18,4 <sup>b</sup>           |

a) bezogen auf  $\epsilon_{665} = 110\ 000$  für  $P_r$  (Brandlmeier et al., 1981a)

b) bezogen auf  $\epsilon_{665} = 35\ 500$  für das PC-Chromopeptid-Kation  
(Glazer, A.N. und Fang, S.; J. Biol. Chem. 248, 659 (1973))

die höhere Stabilität der ZZE-konfigurierten Chromophore gegenüber Belichtung in neutraler Lösung und die nahezu identische Absorption der freien Basen der ZZE- und ZZZ-konfigurierten Chromophore. So könnte der hohe  $P_r$ -Anteil beim Erwärmen der meta-Rb-Probe auf  $0^\circ \text{ C}$  (Abb. 25 C) von einem gebleichten, bereits ZZZ-konfigurierten Chromophor resultieren, der sich in seinen spektralen Eigenschaften kaum von dem ZZE-konfigurierten meta-Rb-Chromophor unterscheidet und auch aus diesem photochemisch bei der intensiven HR-Belichtung (30 min bei 660 nm) entstanden sein könnte. Dies würde bedeuten, daß der proteinentkoppelte ZZE-konfigurierte Chromophor bei erneuter Proteinkopplung den  $P_{fr}$ -Chromophor ergibt, während ausgehend vom ZZZ-Chromophor  $P_r$  entsteht. Ein analoges Ergebnis liefern die Versuche mit dehydratisiertem Phytochrom. Dehydratisieren von  $P_{fr}$  ergibt einen "freien" ZZE-Chromophor (nachgewiesen durch Ansäuern und Belichtung; Abb. 28), der bei Rehydratisieren wieder  $P_{fr}$  liefert. Dehydratisieren von  $P_r$  ergibt den "freien" ZZZ-Chromophor, der nach Rehydratisieren wieder  $P_r$  ergibt. In keinem Fall kann spontane Z-E-Isomerisierung im Dunklen beobachtet werden. Dies ist aber ein Beweis dafür, daß auch der  $P_r$ -Chromophor ZZZ- und der  $P_{fr}$ -Chromophor ZZE konfiguriert sind. Daß die Z-E-Isomerisierung bei Belichtung erfolgt, beweist die Tatsache, daß ZZE-konfigurierte Chromophore ausgehend von  $P_r$  immer erst nach Belichtung von  $P_r$  nachweisbar sind. ZZE-konfigurierte Chromophore können dann auch ohne vorherige Bildung von  $P_{fr}$  nachgewiesen werden. Besonders deutlich wird dies im Falle des meta-Rb. Es entsteht durch Belichtung von  $P_r$  um  $-40^\circ \text{ C}$  und trägt nachweislich schon vor der  $P_{fr}$ -Bildung den ZZE-konfigurierten Chromophor (siehe Abb. 26). Dies beweist aber auch, daß die Z-E-Isomerisierung bereits auf dem Weg von  $P_r$  nach meta-Rb stattgefunden haben muß und nicht auf der letzten Stufe der Bildung von  $P_{fr}$  aus meta-Rb erfolgt.

Der Photokonversionszyklus des Bakteriorhodopsin (Braiman und Mathies, 1982) zeigt große Ähnlichkeit mit dem des Phytochroms. Bei tieferen Temperaturen können Intermediate angehängt werden, die auch im Blitzlichtexperiment nachgewiesen werden können. In Übereinstimmung mit Phytochrom führt der Rhodopsinchromophor während der Photokonversion eine Z-E-Isomerisierung durch. Aufgrund von Raman-Resonanzspektroskopie bei niederen Temperaturen schließen Braiman und Mathies (1982), daß diese innerhalb von 10 ps als primäre Photoreaktion abläuft. Das dabei entstehende Intermediat kann bei Temperaturen kleiner gleich  $-120^{\circ}\text{C}$  stabilisiert werden und hat bei Raumtemperatur nur eine sehr kurze Lebensdauer. Außerdem absorbiert es 30 bis 60 nm längerwelliger als die Ausgangssubstanz. Diese Eigenschaften korrespondieren erstaunlich gut mit denen des lumi-R, obwohl keinerlei Verwandtschaft zwischen beiden Chromophoren besteht (im Falle des Bakteriorhodopsins ist er ein Carotinoid, Retinal; im Falle des Phytochroms ein Gallenfarbstoff). Trotzdem zeigen diese Versuche am Bakteriorhodopsin, daß auch für das Phytochrom die Z-E-Isomerisierung als photochemische Primärreaktion möglich ist.

Aufgrund der höheren Reaktivität des  $P_{fr}$  gegenüber  $P_r$  bei der Oxidation mit Kaliumpermanganat schließen Hahn et al. (1980) auf eine stärkere Exponierung des  $P_{fr}$ -Chromophors gegenüber dem  $P_r$ -Chromophor. Dies bestätigt der Versuch mit Tetranitromethan, da unter Bedingungen, bei denen auch der ZZZ-konfigurierte freie Chromophor sofort zerstört wird (damit scheidet höhere Reaktivität des ZZE- gegenüber dem ZZZ-Chromophor aus), das  $P_r$ -Absorptionsspektrum nicht verändert wird, dagegen der  $P_{fr}$ -Chromophor sofort reagiert. Die stärkere Exponierung des  $P_{fr}$ -Chromophors scheint allerdings (ähnlich wie die Dunkelreversion des  $P_{fr}$ ) ein Proteolyseartefakt zu sein, da bei Versuchen mit 124 KD-Phytochrom der  $P_r$ - und  $P_{fr}$ -Chromophor etwa die gleiche Stabilität gegenüber den denaturierenden Reagentien besitzen. Erst während der Photokonversion erfolgt eine Reaktion (pers. Mitteilung Dr. Inoue, 1983). Dies würde aber dann bedeuten, daß die Intermediat-Chromophore gegenüber dem  $P_r$ - und  $P_{fr}$ -Chromophor leichter zugänglich sind.

## 8. Abschließende Diskussion

In den vorangegangenen Kapiteln konnte gezeigt werden:

- a) Der  $P_{fr}$ -Chromophor ist das 15E-Isomer des all-Z- $P_r$ -Chromophors.
  - b) Die Z-E-Isomerisierung ist nicht der letzte Schritt bei der Photokonversion von  $P_r$  nach  $P_{fr}$  (siehe Kap. II.7.4.)
- Weiterhin kann als sicher gelten:

- c) Der  $P_r$ - und der  $P_{fr}$ -Chromophor besitzen eine gestreckte Konformation (siehe Kap. II.1.2.).
- d) Die langwellige  $P_{fr}$ -Absorption ist keine direkte Folge der E-Z-Isomerisierung, sondern die Folge einer zusätzlichen Chromophor-Protein-Wechselwirkung (siehe Kap. II.6.).

Für die anschließende Diskussion eines möglichen Reaktionsmechanismus der Phytochrom-Photokonversion wird folgendes angenommen:

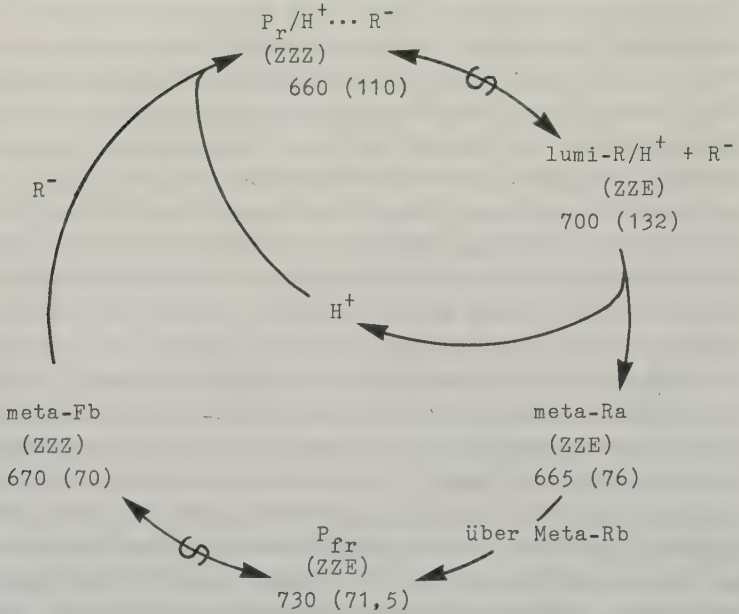
- e) Der  $P_r$ -Chromophor ist am Pyrrolstickstoff des Ringes C (siehe (1a)) protoniert; dies ist wahrscheinlich wegen der erstaunlich guten Übereinstimmung der Spektraldaten des protonierten Isophorcabilin ( $\lambda_{max}$  ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ); 406 nm (18), 631 (Schulter), 697 nm (103); entnommen aus Abb. 4b) mit denen des  $P_r$  (vergleiche mit Tabelle 1). Lagarias und Rapoport (1980) und Sugimoto et al. (1977) diskutieren ebenfalls eine ionische Struktur des  $P_r$ -Chromophors.
- f) Die Z-E-Isomerisierung ist die primäre photochemische Reaktion in der Photokonversion des Phytochroms; dies ist denkbar, da sie auch für das Rhodopsin und das Bakteriorhodopsin als Primärreaktion diskutiert wird (Honig et al., 1979), für welche wesentlich mehr experimentelle Daten zur Verfügung stehen. Phytochrom und Rhodopsin bzw. Bakteriorhodopsin stellen vergleichbare Systeme dar; sie beinhalten jeweils einen beweglichen Chromophor, der im Laufe des Photokonversionszyklus Z-E-Isomerisierung erleidet. Darüber hinaus bestehen zwischen diesen Photokonversionszyklen deutliche Parallelen (siehe Kap. II.7.4.).

Honig et al. (1979) formulierten eine Modellreaktion für die Photokonversion des Rhodopsins bzw. des Bakteriophodopsins. Sie wird von den Autoren als allgemein gültiges Modell für die Umwandlung von Licht in chemische Energie für den Fall von beweglichen Chromophoren, die photoisomerisiert werden können, diskutiert.

Das Modell besteht in einer photochemisch induzierten Ladungstrennung als Folge einer geometrischen Änderung im Chromophor. Nach Honig et al. besteht im Falle des Rhodopsins und Bakteriophodopsins das Ladungspaar aus der (nachweislich) protonierten Schiff'schen Base, über die das Retinal an einen Lysinrest der Peptidkette des Opsins (dem Proteinanteil bei den beiden Chromoproteinen) gebunden ist, und einem negativ geladenen Rest der Peptidkette, der nahe genug an die Schiff'sche Base heranreicht. Im Phytochrom könnte zwischen dem  $H^+$  im  $P_R$ -Chromophor (siehe oben Punkt e) und einer negativen bzw. partiell negativen Gruppe des Proteins eine Salzbrücke bestehen. Als Folge der Ladungstrennung entstehen nach Meinung der Autoren immer Primärprodukte mit bathochrom verschobener Absorption, da diese Ladungstrennung zu einer stärkeren Delokalisierung der  $\pi$ -Elektronen führen soll. In der Tat besitzt auch Bathorhodopsin (Primärprodukt bei der Phototransformation des Rhodopsins; Honig et al., 1979) gegenüber Rhodopsin eine bathochrom als auch hyperchrom geänderte Absorption (Yoshizawa und Wald, 1963), gleiches scheint auch für lumi-R gegenüber  $P_R$  zu gelten (siehe Kap. II.7.2.4.).

Unter Berücksichtigung der Spektral- und photochemischen Daten der Phytochromintermediate ist im Schema der Abb. 35 eine Übertragung der Modellreaktion von Honig et al., (1979) auf das Phytochromsystem wiedergegeben. Im wesentlichen verläuft die Photokonversion des Phytochroms in der  $P_R$ -Form nach diesem Schema in drei Hauptschritten:

Abb. 35: Schema der Phytochrom-Photokonversion (modifiziert in Anlehnung an das Schema für die Photokonversion des Rhodopsins nach Honig et al., 1979)



- $\longleftrightarrow$  (with circle) Photoreaktion  
 $\longrightarrow$  Dunkelrelaxation  
 (ZZZ) Konfiguration der Methinbrücken  
 660 (110) Absorptionsmaximum (nm), in Klammern molare Absorption ( $\epsilon \times 10^{-3}$ ; siehe Tab. 1 und 11)  
 ..... Salzbrücke

- 1) Photoisomerisierung von  $P_r$  verbunden mit der Ladungstrennung (Bildung von lumi-R).
- 2) Deprotonierung (Bildung meta-Ra).
- 3) Ausbildung einer neuen Chromophor-Protein-Wechselwirkung, die zur langwelligen Absorption von  $P_{fr}$  führt.

Die Rückreaktion von  $P_{fr}$  zu  $P_r$  würde dann nur über zwei Hauptschritte verlaufen:

- 1) Photoisomerisierung von  $P_{fr}$ , verbunden mit der Aufhebung der spezifischen Protein-Wechselwirkung des  $P_{fr}$ -Chromophors (Bildung von meta-Fb).
- 2) Protonierung, verbunden mit der  $P_r$ -Bildung; die Protonierung und die Ausbildung einer neuen Salzbrücke im  $P_r$  könnte bei diesem Schritt gleichzeitig verlaufen (z.B. wenn der Rest R gleichzeitig den Protonendonator darstellt), weshalb dann für diesen Schritt auch keine Intermediate mit charakteristischen Absorptionseigenschaften existieren würden (wie das im Gegensatz dazu bei der  $P_r$ -Photokonversion der Fall zu sein scheint).

Zur experimentellen Bestätigung dieses Modells können folgende Beobachtungen angeführt werden:

- a) Die protonierten Phytochromspezies besitzen sehr ähnliche Absorptionseigenschaften wie protoniertes Isophorcabilin (siehe oben)
- b) die nicht protonierten Phytochromspezies (meta-Ra, meta-Fb  $P_{fr}$ ) haben ähnliche Absorptionseigenschaften (im Falle des  $P_{fr}$  zumindest einen ähnlichen Absorptionskoeffizienten) wie neutrales Isophorcabilin (freie Base des Isophorcabilin:  $\lambda_{max} (\epsilon \times 10^{-3})$  ; 610 nm (71), entnommen aus Abb. 4b).
- c) Die Absorptionseigenschaften und die chemische Stabilität von lumi-R korrespondieren gut mit den Eigenschaften des Bathorhodopsins (siehe oben und Kap. II.7.4.).
- d) Tokutomi et al. (1982) fanden reversible pH-Änderungen bei der Photokonversion des Phytochroms in ungepufferter Lösung.

Diese Beobachtungen würden aber auch mit einem intramolekularen Protonentransfer als Primärschritt der Phytochromphoto-transformation im Einklang stehen, den Song et al. (1979) postulieren. Das Hauptargument für diese Annahme ist ihre Beobachtung, daß die Photokonversion des Phytochroms einen deutlichen Isotopeneffekt zeigt (Sarkar und Song, 1981) (in  $D_2O$  verläuft sie langsamer als in  $H_2O$ ). Da aber auch im Modell der Abb. 35 Protonierung und Deprotonierung stattfinden, kann der Isotopeneffekt auch auf einer späteren Stufe des Phototransformationszyklus eine Rolle spielen und muß nicht unbedingt den primären photochemischen Prozess betreffen. Um diese Fragen endgültig beantworten zu können, bedarf es weitergehender Experimente. Über die Natur der Wechselwirkung des Phytochromchromophors mit dem Protein, die zur langwelligen Absorption des  $P_{fr}$  führt, gibt es bislang keine direkten experimentellen Hinweise. In freien Gallenfarbstoffen können allerdings bathochrome Absorptionsverschiebungen auf vielfältige Weise erzielt werden:

- Deprotonierung unter Bildung des Chromophoranions. Bei den A-Dihydrobinindionen erfolgt sie bevorzugt am Stickstoffatom des gesättigten Ringes A (Falk und Zrunek, 1983). Sie erfolgt allerdings erst bei pH-Werten  $> 11$ ).
- Zinkkomplexe der Gallenfarbstoffe zeigen schon bei pH-Werten größer gleich 8 deutlich bathochrom verschobene Absorption (Scheer, 1976; Krauss, 1980). Die Struktur dieser Chromophore ist noch unsicher<sup>a</sup>. Bei Zugabe von  $J_2$  zu diesen Zinkkomplexen entstehen langlebige  $\pi$ -Radikale mit stark bathochrom verschobener Absorption (Krauss und Scheer, 1979)

---

a) Auf diese Chromophorspezies ist die Schulter bei 730 nm im Spektrum des E-PC-Chromopeptid in 20% wässrigem Pyridin der Abb. 9 zurückzuführen. Das ist ein Hinweis auf geringfügige Verunreinigung der Probe mit Zinkionen.

- Durch Adsorption freier Gallenfarbstoffe an Kieselgel oder Aluminiumoxid (Falk et al., 1978b; Braslavsky et al., 1981). Die Ursache für diese Absorptionsverschiebung ist noch unklar, denkbar wäre eine für einige Anthocyaninfarbstoffkomplexe charakteristische Copigmentierung (Brouillard, 1983).

Nach theoretischen Berechnungen (pers. Mitteilung Prof. Schneider) führen elektronische Wechselwirkungen des  $\pi$ -Elektronensystems der Gallenfarbstoffe mit nahe benachbarten punktförmigen Ladungen ebenfalls zu deutlichen bathochromen Absorptionsverschiebungen. Es ist leicht vorstellbar, daß im Phytochrom durch Konformationsänderungen des Chromophors und des Proteins als Folge der Z-E-Isomerisierung des Chromophors eine geladene Gruppe in die Nähe des Chromophors gelangt und so die langwellige  $P_{fr}$ -Absorption induziert. Diese Wechselwirkung müßte sehr empfindlich auf Strukturänderungen im Protein reagieren und dies könnte auch der Grund sein, weshalb die Absorption des  $P_{fr}$  (zumindest im degradierten Phytochrom) im Gegensatz zu  $P_r$  sehr empfindlich auf die Pufferzusammensetzung (Yamamoto und Smith, 1981) und auf denaturierende Reagentien reagiert (siehe Kap. II.7.3.).

Bei dem Versuch die Absorptionsspektren der denaturierten Phytochromspezies zu interpretieren stand bisher die C5-Methinbrücke im Mittelpunkt der Untersuchungen, da sie leicht Photooxidation oder Photoaddition unterworfen werden kann (Grombein et al., 1975; Krauss, 1980). Dies ist eine Folge der hohen Reaktivität dieser Methinbrücke in den A-Dihydrobilindionen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen aber, daß nicht die chemisch reaktive C5-Methinbrücke, sondern die inerte C15-Methinbrücke das Zentrum der Photoreaktivität der Phytochromphototransformation darstellt. Es ist auffällig, daß bei allen Biliproteinen trotz sehr unterschiedlicher Absorptionseigenschaften und Photoreaktivität die Chromophore über den Dihydroring kovalent an das Protein gebunden sind. Deshalb kann die Aus-

bildung der Dihydrostruktur der Gallenfarbstoffchromophore auch als eine Folge der kovalenten Bindung der Chromophore an das Protein betrachtet werden (eventuell ist die Reduzierung des A-Rings eine Art Aktivierungsschritt für die Ausbildung des Thioethers mit Cystein, denn das resultierende Dihydrobiliverdin besitzt eine äußerst reaktive Vinylgruppe; Köst und Benedikt, 1982) und muß nicht mit dessen photochemischer Funktionsweise in direktem Zusammenhang stehen.

### III. Zusammenfassung

- 1) Es wird ein relativ einfaches Verfahren zur Anreicherung von degradiertem Phytochrom (60 KD) aus etioliierten Haferkeimlingen beschrieben, das nahezu reines Phytochrom liefert ( $A_{660}:A_{280}$  rund 0,7).
- 2) Degradiertes Phytochrom mit  $M_r = 120$  KD konnte mit der von Smith und Daniels (1981) beschriebenen Affiblu-Chromatographie in relativ hoher Reinheit ( $A_{660}:A_{280} = 0,1$ ) isoliert werden.
- 3) Es wird ein Verfahren zur Isolation von reinen  $P_{fr}'$ -Chromopeptiden beschrieben. Sie werden durch Pepsinabbau von grob angereichertem Phytochrom in der  $P_{fr}$ -Form hergestellt. Das  $P_{fr}'$ -Chromopeptid besitzt die gleichen spektralen und photochemischen Eigenschaften wie denaturiertes  $P_{fr}$ :  $\lambda_{max}$  rund 610 nm; im Dunklen revertiert es langsam (temperaturabhängig), bei Belichtung sofort zum gegenüber Belichtung stabilen  $P_r'$ -Chromopeptid mit  $\lambda_{max}$  rund 660 nm.
- 4) Es wird eine schnelle Anreicherungsmethode von C-Phycocyanin aus der Blaualge Spirulina maxima beschrieben, ebenso die Präparation von reinen Chromopeptiden aus dem angereicherten Phycocyanin.
- 5) Die Methode von Falk et al. (1980) zur Herstellung E-konfigurierter Gallenfarbstoff-Modellchromophore wurde modifiziert auf OEBV und DHOEBV angewandt. Sie besteht in der reversiblen Anlagerung eines Nucleophils an das C-10 und der anschließenden Photoisomerisierung des entstandenen rubinoiden Zwischenproduktes. Zuletzt erfolgt Eliminierung des Donors und Auftrennung des Reaktionsgemisches. Durch Anpassung dieser Reaktionsfolge an die Wasserlöslichkeit der  $P_r'$ - und PC-Chromopeptide konnte auch von diesen reine, E-konfigurierte Chromopeptide hergestellt werden.

- 6) Die E-konfigurierten Bilindione zeigen sehr gute Übereinstimmung mit den spektralen und photochemischen Eigenschaften, ebenso mit dem chromatographischen Verhalten des  $P_{fr}'$ -Chromopeptids. Weiterhin besitzen sie unter vergleichbaren Bedingungen auch einen übereinstimmenden CD und LICD.
- 7) Mit Hilfe von hoch auflösender  $^1H$ -NMR-Spektroskopie an reinem  $P_{fr}$ - und E-konfigurierten PC-Chromopeptiden und Modellchromophoren konnte bewiesen werden, daß der  $P_{fr}'$ -Chromophor das 15E-Isomer des all-Z- $P_r'$ -Chromophors darstellt.
- 8) Mit Hilfe von UV-Vis und CD-Messungen an reversibel und irreversibel denaturiertem  $P_r$  und  $P_{fr}$  konnte nachgewiesen werden, daß auch im intakten Phytochrom der  $P_{fr}$ -Chromophor das 15E-Isomer des all-Z- $P_r$ -Chromophors darstellt.
- 9) Es wurde ein Tieftemperaturzusatzgerät für das Zweiwellenlängen-Spektralphotometer entwickelt, mit dem die Aufnahme von Absorptionsspektren von  $25^\circ C$  bis  $-160^\circ C$  möglich ist. Gleichzeitig ermöglicht es die leichte Zugänglichkeit und Austauschbarkeit der Probenküvette bei jeder Temperatur.
- 10) Mit Hilfe der Tieftemperaturspektroskopie und gleichzeitiger Datenspeicherung der aufgenommenen Absorptionsspektren konnten die reinen Intermediate der Phytochrom-Photokonversion erstmals spektral charakterisiert werden. Weiterhin konnte dabei gezeigt werden, daß die Z-E-Isomerisierung des Chromophors keinen späten sondern einen frühen Schritt während der Photokonversion darstellt.
- 11) Die unterschiedliche Reaktivität der Chromophore im intakten und denaturierten Phytochrom im Hinblick auf die Z-E-Isomerisierung wird diskutiert. Ebenso wird auf die Ähnlichkeit des Photokonversionszyklus des Phytochroms mit denen des Rhodopsins und des Bakteriorhodopsins hingewiesen. Mit Übertragung der weitergehenden experimentellen Befunde über den Reaktionsmechanismus der Photokonversion

der Retinal-Proteine auf das Phytochrom und unter Berücksichtigung der gewonnenen Daten über die Phytochromintermediate wird ein möglicher Reaktionsmechanismus der  $P_r \longleftrightarrow P_{fr}$  Phototransformation diskutiert. Im Wesentlichen besteht er in der Z-E-Isomerisierung des Chromophors als primärer photochemischer Prozess, der gleichzeitig zu einer Ladungstrennung zwischen einer Ladung am Chromophor und dem Protein führt. Die dabei entstehenden Intermediate unterscheiden sich nach diesem Modell hinsichtlich der Chromophorkonfiguration und dem Protonierungsgrad.

#### IV. Material und Methoden

##### 1. Geräte

##### 1.1. Photometer

UV-Vis-Spektren wurden entweder mit dem 2-Strahl-Spektralphotometer DMR 22 mit Doppelmonochromator (Fa. Zeiss, Oberkochen), insbesondere die Spektren der Abb. 3, 6, 8, 9, 28, 31, 32, 34a-c, oder mit dem 2-Wellenlängen-Spektralphotometer SIGMA ZWS-11 (Sigma Instruments, Berlin) aufgenommen (Tief-temperaturspektren und Spektren der Abb. 2, 29, 30). Letzteres war direkt mit einem 8110 elektronischen Schreiber mit Datenverarbeitung und Speicherkapazitäten (Bascon-Turner Instruments, Maa. USA) verbunden. Das 2-Wellenlängen-Spektralphotometer wurde im Einstrahlbetrieb eingesetzt. Dazu wurde der Referenzstrahl fest auf 800 nm eingestellt und zum automatischen Abgleich der optischen Eigenschaften der Probe benutzt. Kontrollmessungen zeigten, daß diese Kalibrierung mit flüssigen und gefrorenen Proben arbeitete. Die Spektren wurden mit dem Meßstahl innerhalb des gewünschten Spektralbereichs aufgenommen und auf die gespeicherte Basislinie korrigiert, die mit einer Leerwertprobe aufgenommen wurde. CD-Spektren wurden mit dem Gerät Dichrographie Mark V (Yvon-Jobin, Longjumeau, France) bei 10° C in zylindrischen Quarzküvetten aufgenommen.

##### 1.2. Tieftemperatur-Zusatzeinrichtung für das 2-Wellenlängen-Spektralphotometer

Sie ermöglichte die Aufnahme von Absorptionsspektren von Raumtemperatur bis -160° C. Die Kühlung des Küvettenhalters und der Küvette erfolgte mit Hilfe eines kalten Stickstoff-Gasstroms. In Abb. 35 A und B ist die Vorrichtung dargestellt. Der gekühlte Stickstoff-Gasstrom 1 durchströmt den Küvettenhalter 14, der in einem gegen Wärme isolierten Gehäuse 12 untergebracht ist, über dafür vorgesehene Kanäle K. Nach Durchströmen des Küvettenhalters fließt der daraufhin leicht

Abb. 36A:

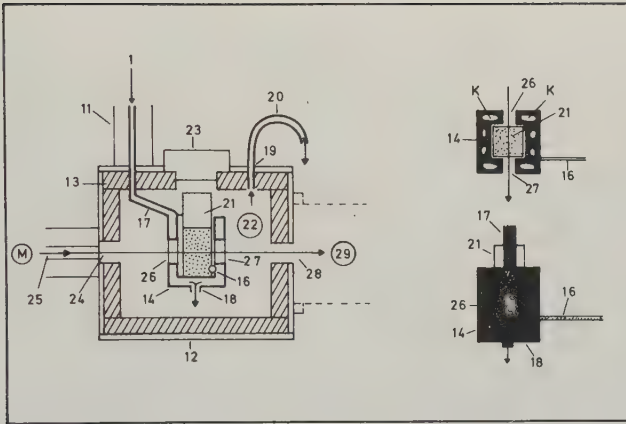
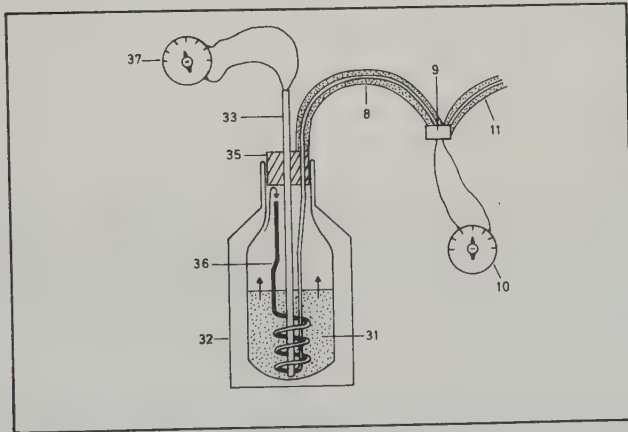


Abb. 36B:



erwärmte Gasstrom über die Öffnung 18 in den Küvettenraum 22 und erzeugt dabei einen leichten Überdruck, der den Eintritt von feuchter Luft (Beschlagen der Küvette) verhindert. Der Gasstrom wird dann über das Auslaßrohr 20 abgeleitet. Der Behälter 12 weist noch weitere Öffnungen auf und zwar: Die für den Lichtweg des Photometers notwendigen, nicht durch Glas-

fenster verschlossenen Öffnungen 24 (für den Lichtleiter 25 vom Monochromator M) und 28 (zum Photomultiplier 29). Im Lichtdurchlaß befinden sich auch dementsprechend im Küvettenhalter 14 die beiden Öffnungen 26 und 27. Zur Temperaturmessung befindet sich im Küvettenhalter ein Thermoelement 16. Aufgrund des Überdrucks von trockenem Stickstoffgas im Gehäuse kann der Küvettenraum über einen Deckel 23 ohne weiteres kurzzeitig geöffnet werden (z.B. zum Auswechseln der Küvette oder zur Zugabe von Chemikalien zur Probe). Setzt man leicht beschlagene Küvetten ein, so werden diese beim Umspülen durch den Gasstrom in kürzester Zeit wieder völlig klar. Als Kühlgas wurde Stickstoff verwendet, der aus flüssigem Stickstoff durch leichtes Erwärmen (Tausiederprinzip) entwickelt wurde. Bei der in Abb. 35 B gezeigten Vorrichtung befindet sich der flüssige Stickstoff 31 in einem Dewar-Gefäß 32. Über einen einstellbaren Widerstand 37 regelbare Heizpatrone 33, die in den flüssigen Stickstoff eintaucht, wird dieser zur Verdampfung gebracht. Da das entwickelte Stickstoffgas durch einen Stopfen 35 am Verlassen des Gefäßes gehindert wird, strömt es über eine Kühlschlange 36, die in den flüssigen Stickstoff eintaucht und so das entwickelte Stickstoffgas bis zum Verlassen des Dewar-Gefäßes kühl hält. Das Kühlgas wird dann über wärmeisolierte Leitungen 8, 11 weitergeleitet. Die Temperaturregelung wird über eine regelbare, elektrische Heizpatrone 9, 10 erreicht.

### 1.3. Belichtungseinrichtungen, Filter

Die Belichtung der Proben mit einem Volumen bis zu 3 ml erfolgte in den Küvettenräumen der Spektralphotometer. Im DMR 22 erfolgte die Phototransformation der Phytochromproben mit einer Eigenbau-Belichtungseinrichtung (Grombein, 1976; Brandlmeier, 1981). Hauptbestandteile dieser Apparatur sind eine

12V-Halogenlampe und 2 Interferenzfilter (Fa. Searom, Argenteil, Frankreich) mit Wellenlängen von 660,3 nm (Halbwertsbreite HW: 12,8 nm; maximale Transmission  $T_{\max}$ : 78%) und 728,3 nm (HW: 14 nm,  $T_{\max}$ : 75%). Gemessen im Bereich des Meßstrahls des Photometers ergab sich für das HR-Filter eine Lichtflußrate von  $64 \text{ W/m}^2$ , für das DR-Filter von  $31 \text{ W/m}^2$ . Größere Phytochrommengen wurden mit derselben Belichtungseinrichtung in einer Plastikdunkelbox (30 x 20 x 15 cm) bestrahlt. Beim 2-Wellenlängen-Spektralphotometer wurde die Belichtung der Probe mit einer Lichtversorgung (Volpi Intralux 150H, Volpi GmbH, Denzlingen) erreicht, die mit einem Lichtleiter und folgenden Interferenzfiltern (Fa. Dr. R. Seitner, Mess- und Regeltechnik, Herrsching) verbunden war: 600 nm, HW = 11,6 nm,  $T_{\max} = 50\%$ , Lichtflußrate  $4,1 \text{ W/m}^2$ ; 660 nm, HW = 10,1 nm,  $T_{\max} = 50\%$ , Lichtflußrate =  $4,4 \text{ W/m}^2$ ; 730 nm, HW = 12,9 nm,  $T_{\max} = 45\%$ , Lichtflußrate =  $0,2 \text{ W/m}^2$ .

#### 1.4. Rechner

Die rechnerische Analyse von UV-Vis-Spektren wurde mit einem programmierbaren Schreiber der Fa. Bryans Southern, USA, Modell BS 8110, durchgeführt.

#### 1.5 NMR-Spektrometer

80 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden mit einem Bruker WP 80 FT NMR-Gerät mit Aspect 2000 Datensystem (Fa. Bruker, Karlsruhe) bei  $35^\circ \text{C}$  aufgenommen<sup>a</sup>. Die 500 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren wurden mit einem Bruker WM 500 FT NMR-Gerät (Quadraturdetektion) mit Aspect 2000 Datensystem bei  $10^\circ \text{C}$  in der Fa. Bruker, Analytische Meßtechnik, Karlsruhe aufgenommen<sup>b</sup>.

- 
- a) Die Ausführung besorgte freundlicherweise Dr.E.Cmiel von der TU Garching
- b) Die Spektren wurden freundlicherweise von Dr.V.Formacek und Dr.G.-J.Wolff von der Fa. Bruker, Karlsruhe aufgenommen.

#### 1.6. Durchflußphotometer, Fraktionssammler

Die Transmission von Säuleneluaten wurde mit einem Durchflußphotometer Uvicord II der Fa. LKB (Schweden) bei 280 nm gemessen und mit einem Schreiber Typ WPS 1 der Fa. Colora (Lorch) registriert. Eluate wurden mit Fraktionssammlern Typ Mini Escargot der Fa. Gilson (Frankreich) gesammelt.

#### 1.7. Zentrifugen

Niederschläge wurden mit der Kühlzentrifuge G 50 K der Fa. WKF (Brandau/Darmstadt) abzentrifugiert. Dabei kamen folgende Rotoren zum Einsatz:

6 x 1000 ml mit 14 000 g bei 8000 Upm, 6 x 500 ml mit 18 000 g bei 10 000 Upm, 6 x 250 ml mit 42 000 g bei 16 500 Upm, 6 x 100 ml mit 42 000 g bei 20 000 Upm und 8 x 38 ml mit 40 000 g bei 20 000 Upm.

#### 1.8 Gefriertrocknung

Zur Gefriertrocknung von Phytochromproben wurde eine Anlage vom Modell L 03 (WKF, Brandau) verwendet.

### 2. Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt, hatten alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien den Reinheitsgrad "zur Analyse" und wurde zur Herstellung aller Lösungen demineralisiertes Wasser verwendet.

### 3. Isolierung von Phytochrom

#### 3.1. Sicherheitsvorkehrungen

Sämtliche Arbeiten mit Phytochrom wurden unter grünem Sicherheitslicht, das Phytochrom nur minimal absorbiert durchgeführt. Dazu wurde die von Leuchtstoffröhren (Philips TL 40 W/17) emittierte Strahlung durch eine dreiteilige Plexiglaskombination in der Anordnung grün-orange-grün (Fa. Röhm und Haas GmbH Darmstadt, Nr. 478 orange, Nr. 701 grün) gefiltert. Zur Vermeidung von Verlusten wurden Phytochromlösungen stets entweder im Eisbad oder im Kühlraum bei ca.  $4^{\circ}\text{C}$  (Säulenchromatographie) gehalten und zur längeren Aufbewahrung mit Glycerin versetzt (Endkonzentration = 5%, v:v) und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Als Oxidationsschutz bei der Bereitung des Rohextraktes und bei der Brushit-Chromatographie diente  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , das gleichzeitig Proteasen hemmt (Grombein, 1976), für alle weiteren Reinigungsschritte dient 2-Mercaptoethanol (Merck, zur Synthese) als Oxidationsschutz.

#### 3.2. Pflanzenmaterial und Aufzucht.

Wegen ihres vergleichsweise hohen Phytochromgehalts (Siegelman und Firer, 1964) dienten etioliierte Haferkeimlinge (Avena sativa, L.Var.Pirol, Baywa München) als Pflanzenmaterial. Es wurde ungebeiztes Samenmaterial benutzt. Zur Keimung des Saathafers wurden je 2,8 l Vermiculith (Körnung Nr. 4) in Plastikwannen (60 x 50 cm) ausgebreitet, mit 2 l Leitungswasser von ca.  $40^{\circ}\text{C}$  getränkt und darauf 300 g des Saathafers gleichmäßig ausgeät. Zuletzt wurden die Plastikwannen mit Lochplatten (Lochdurchmesser: 3 mm) abgedeckt und der Samen in einem Brutschrank (11701, Fa. Hofmann, Nellingen/Frankreich) bei  $27 - 28^{\circ}\text{C}$  und maximaler Luftfeuchtigkeit im Dunklen zum Keimen gebracht. Nach ca. 3,5 Tagen wurden die rund 1,5 bis 2,5 cm langen

Keimlinge unter grünem Sicherheitslicht mit einer Spachtel über der Lochplatte abgeschnitten und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren aufbewahrt. Die durchschnittliche Ausbeute betrug ca. 100 g Keimlinge pro Platte.

### 3.3. Spektralphotometrische Bestimmung der Phytochrom-Konzentration und Reinheit

Die Phytochromkonzentrationen werden in PE (= Phytochromeinheiten) pro ml angegeben mit  $1\text{ PE} =$  die Menge an Phytochrom in der  $P_r$ -Form, die in einem ml bei der Schichtdicke 1 cm einen  $\text{OD}_{660}$  von 1 besitzt. Die Bestimmung von  $\text{OD}_{660}$  in stark streuenden, grob angereicherten Phytochromlösungen erfolgte mit Hilfe der Messung der Absorptionsdifferenz  $\Delta A = A_{660} - A_{730}$  jeweils nach Belichtung der Meßlösung mit HR (660 nm) bzw. DR (730 nm). Die Differenz der so erhaltenen Werte ( $\Delta(\Delta A)$ ) entspricht dann in etwa der  $P_r$ -Absorption bei 660 nm (Grombein, 1976). Nach dem von Brandlmeier et al. (1981a) und von Roux et al. (1982) für 60 KD bzw. für 120 KD Phytochrom angegebenen Absorptionskoeffizienten von  $P_r$  entspricht damit ein PE einer Phytochromproteinmenge von rund:

(für 60 KD-Phytochrom) 0,5 mg

(für 120KD-Phytochrom) 1,0 mg

In höher angereicherten, nicht streuenden Phytochromlösungen kann die Menge an  $P_r$  und  $P_{fr}$  auch im Gemisch miteinander spektralphotometrisch bestimmt werden. Dies geschieht mit Hilfe der Spektraldaten von reinem  $P_r$  und  $P_{fr}$ , die in Tab. 1 aufgelistet sind und der Abb. 2 entnommen werden können. Da  $P_r$  bei 730 nm vernachlässigbar klein absorbiert (siehe Abb. 2a), gilt bei einer Schichtdicke von 1 cm nach Lambert-Beer:

$$c^{Pfr} = A_{730} / \epsilon_{730}^{Pfr}$$

Da  $P_{fr}$  bei 660 nm merklich absorbiert (siehe Abb. 2c) gilt für die Menge an  $P_r$  in Mischung mit  $P_{fr}$  (nach Neubacher und Lohmann, 1978):

$$c^{Pr} = A_{660} / \epsilon_{660}^{Pr} - c^{Pfr} \times \epsilon_{660}^{Pfr} / \epsilon_{660}^{Pr}$$

Für die relative Konzentration von  $P_r$  und  $P_{fr}$  in der Probe mit  $\epsilon_{660}^{Pr} = 1$  gilt dann:

$$c^{Pfr} = A_{730} / 0,65$$

$$c^{Pr} = A_{660} - c^{Pfr} \times 0,27$$

Als Kriterium für die Reinheit der Phytochromproben diene das Absorptionsverhältnis  $A_{660} : A_{280}$  (= Reinheitsindex, z.B. Pratt, 1982) der Probe. Im reinen Phytochrom liegt es bei rund 1 (Rice et al., 1973).

#### 3.4. Konventionelle Reinigung von Phytochrom (60 KD)

Das Verfahren entspricht in den wesentlichen Schritten der Isolation von Roggenphytochrom (Rice et al., 1973), welches von Hunt und Pratt (1979) für die Gewinnung von Hafer-Phytochrom modifiziert wurde. Haferphytochrom degradiert im Rohextrakt sehr schnell zum stabileren 60 KD-Phytochrom (Rice und Briggs, 1973) und kann nach folgender Methode relativ einfach isoliert werden.

Rohextrakt:

Das Pflanzenmaterial wurde in 1,5 Kg-Einheiten noch tiefgefroren in einem 4 l fassenden Waring Blendor im Extraktionspuffer (1 l) zerkleinert (1 min bei voller Geschwindigkeit)

Extraktionspuffer:

50 mM Tris-HCl/pH 8,5; 30 mM  $Na_2SO_3$

Der Rohextrakt wurde im Kältelabor mittels einer handelsüblichen Wäscheschleuder mit 6 l Edelstahltrommel (Fa. Thomas, Neunkirchen, Siegerland) durch eine Lage Leinen und feinem Neylóngewebe (Maschenweite = 0,075 mm; Fadenstärke = 0,040 mm) zentrifugiert. Der bereits relativ klare Rohextrakt (rund 4 l) wurde aufgefangen, mit  $\text{CaCl}_2$  in einer Konzentration von 10 mM versetzt und 10 min gerührt (dieser Schritt führt zur Ausfällung pektinartiger Substanzen). Der Extrakt wurde dann klarzentrifugiert (14 000 x g für 20 min).

Die weitere Reinigung von degradiertem Phytochrom geschah in einer Kombination von verteilungs- und adsorptionschromatographischen Verfahren (siehe Tab. 14). Die Mengenangaben beziehen sich ab hier auf die Aufarbeitung von 3 kg Haferkeimlingen:

#### 1. Calcium-Phosphat-Chromatographie (Brushite)

Das Adsorbens wurde entsprechend der Vorschrift von Siegelman et al. (1965) hergestellt. Für den Extrakt von 3 kg Keimlingen wurden 1 l Brushite (gepacktes Volumen) benötigt. Vor Gebrauch mußte der Brushite aktiviert werden. Dazu wurde zu dem Brushite 468 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  zugegeben (Endkonzentration = 0,45 M), mit Wasser auf 6 l aufgefüllt und vorsichtig (Rührstab) 24 h bei 25° C gerührt. Der Säulendurchmesser für diese Adsorptionschromatographie wurde relativ groß gewählt, um eine gute Laufgeschwindigkeit zu erzielen ( $\varnothing$  18 cm, Laufgeschwindigkeit ca. 2 l/h).

Waschpuffer:                    10 mM KPP/pH 7,5  
                                  2 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_3$

Elutionspuffer:  
(Elution in einem        60 mM KPP/pH 7,5  
Schritt)                    2 mM  $\text{Na}_2\text{SO}_3$

Vor dem Auftrag wurden pro 100 ml Extrakt 1 ml 0,5 M  $\text{K}_3\text{PO}_4$  und 1 ml 0,5 M EDTA zugegeben und der pH auf 7,5 eingestellt.

## 2. Ionenaustauschchromatographie an Carboxymethyl-Sephadex (Sigma C-50-120)

Dieser Schritt ist selektiv für 60 KD-Phytochrom, da größeres Phytochrom bei dem pH-Bereich in dem hier gearbeitet werden muß, irreversibel denaturiert (bei pH Werten kleiner 7; Gottmann, 1981). Um eine größtmögliche Menge an Phytochrom in der 60 KD-Form zu erhalten, wurde das Brushit-Eluat nach einer Ammoniumsulfatfällung (200 g/l) zwei Tage gegen einen Puffer mit geringer Ionenstärke (10 mM Tris-HCl/pH 7,8; 10 mM KCl, 0,1% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 1 mM EDTA) bei 4° C dialysiert. 7 g Säulenmaterial hatten ausreichende Bindungskapazität für die anschließende Chromatographie (Säulendurchmesser = 5 cm).

Waschpuffer: 50 mM KPP/pH 6,0  
0,1% (v:v) 2-Mercaptoethanol

Elutionspuffer: 50 mM KPP/pH 7,0  
(Elution in 0,1% (v:v) 2-Mercaptoethanol  
einem Schritt)

Um das Brushite-Elutat auf pH 6,0 abzusinken wurde es über Nacht gegen Elutionspuffer und anschließend noch 4 h gegen Waschpuffer bei 4° C dialysiert. Vor dem Auftrag wurde der pH des Eluates mit 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  exakt auf pH 6,0 eingestellt (Elutionsdiagramm siehe Abb. 37)

## 3. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacel (Pharmacia)

Säulengröße 2,5 x 20 cm

Waschpuffer 50 mM KPP/pH 7,4  
0,1% (v:v) 2-Mercaptoethanol

Elution mit linearem Gradienten 10 mM Cl (200 ml) - 400 mM (200 ml)  
(in 50 mM KPP/pH 7,4; 0,1% (v:v) 2-Mercaptoethanol).

Das regenerierte Säulenmaterial (siehe Firmenbeschriftung Pharmacia) wurde mit konstanter Flußgeschwindigkeit (200 ml/h) in die

Säule gepackt, mit gleicher Geschwindigkeit das Eluat der CM-Sephadex-Chromatographie direkt aufgetragen, die Säule gewaschen und das Phytochrom eluiert (Abb. 38 zeigt ein typisches Elutionsdiagramm).

4. Brushite-Chromatographie wurde im Verlauf der Reinigung noch ein zweites Mal durchgeführt.

Säulengröße: 2,5 x 20 cm  
Waschpuffer: 10 mM KPP/pH 7,5  
0,1% (v:v) 2-Mercaptoethanol  
Elution mit linearem Gradienten: 10 mM KPP/pH 7,5 (200 ml) - 250 mM KPP/pH 7,5 (200 ml)  
0,1% (v:v) 2-Mercaptoethanol

Vor dem Auftrag wurde das DEAE-Sepharose-Eluat mit 50% Ammoniumsulfat gefällt und der Niederschlag in Waschpuffer aufgenommen und gegen den Waschpuffer dialysiert.

5. Verteilungschromatographie an Biogel A-1,5m (200-400 mesh)

Säulengröße: 1,5 x 95 cm  
Laufpuffer: 100 mM KPP/pH 7,8  
0,1% (v:v) 2-Mercaptoethanol  
1 mM EDTA

Die Phytochromproben wurden vor diesem Schritt durch Ammoniumsulfatfällung (50%) konzentriert; das Volumen der aufgetragenen Proben betrug etwa 2 - 4 ml (rund 1 - 2% des Volumens des gepackten Gels)

- 3.5. Affinitätschromatographische Reinigung von Phytochrom (120 KD)

Sie wurde von Smith und Daniels (1981) zur Reinigung von Roggenphytochrom beschrieben und wurde von Song et al. (1981) zur Gewinnung von Haferphytochrom modifiziert. Diese Reinigungs-

methode beruht auf spezifischen Wechselwirkungen zwischen Phytochrom und Cibacron blue 3GA (immobilisiert an Agarose), die durch FMN wieder aufgehoben werden können. Da die Affi-Gel Blue Chromatographie einen raschen und effektiven Reinigungsschritt darstellt, kann mit ihr relativ einfach 120-KD-Phytochrom angereichert werden.

Säulengröße: 5 x 5 cm

Äquilibrierpuffer: 100 mM KPP/pH 7,8

0,1% (v:v) 2-Mercaptoethanol

Waschpuffer: 0,5 M KCl in Äquilibrierpuffer

Elutionspuffer: 10 mM Flavinmononucleotid (FMN, Sigma, reinst)  
in Äquilibrierpuffer (50 ml)

Frisches Brushitematerial wurde nach der Ammoniumsulfatfällung (200 g/l) in Äquilibrierpuffer aufgenommen und ohne Dialyse direkt auf die Säule aufgetragen.

Zur besseren Bindung des Phytochroms an die Gelmatrix wurde die Säule nach dem Probenauftrag für 30 min abgestellt und zur besseren Desorption nach dem FMN-Auftrag ebenfalls für 30 min abgestellt. Herausgewaschen wurde dann das Phytochrom mit Äquilibrierpuffer und mit 50% Ammoniumsulfat aus den FMN-haltigen Fraktionen ausgefällt und konzentriert. Zur Abtrennung des restlichen FMN wurde anschließend eine Verteilungschromatographie an Biogel A-1,5m (200 - 400 mesh) wie oben beschrieben durchgeführt.

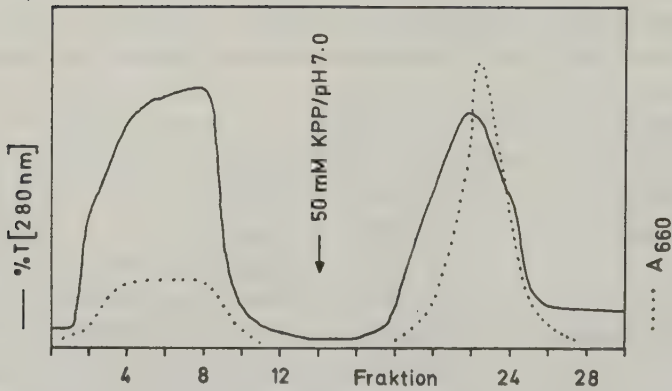


Abb. 37: Elutionsdiagramm der CM-Sephadex-Chromatographie, gestrichelt: Phytochrom

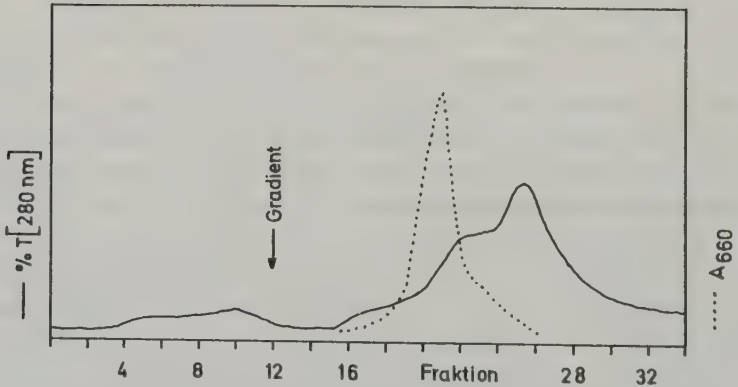


Abb. 38: Elutionsdiagramm der DEAE-Sephadex-Chromatographie, gestrichelt: Phytochrom

Tab. 14: Reinigung von 60 und 120 KD-Phytochrom

|                      | Reinigungsschritt                                 | PE/kg FG <sup>a</sup> | A <sub>660</sub> /A <sub>280</sub> | Anreicherung |
|----------------------|---------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|--------------|
| 60 KD<br>Phytochrom  | Rohextrakt                                        | 20                    | -                                  | -            |
|                      | Brushite-Pool                                     | 13                    | -                                  | -            |
|                      | Ammoniumsulfatfraktionierung 33%                  | 10                    | 1/50                               | -            |
|                      | CM-Sephadex                                       | 6                     | 1/12                               | 4            |
|                      | DEAE-Sepharose                                    | 4                     | 1/3                                | 17           |
|                      | Brushite (Gradient)                               | 2                     | 1/1,5                              | 33           |
|                      | Biogel A-1,5m                                     | 1,5                   | 1/1                                | 50           |
| 120 KD<br>Phytochrom | Wie oben bis zur Ammoniumsulfatfraktionierung 33% | 10                    | 1/50                               | -            |
|                      | Affiblu                                           | 5                     | 1/10                               | 5            |
|                      | Biogel A-1,5m                                     | 3                     | 1/8                                | 6            |

a) Phytochromeinheiten pro kg Frischgewicht

#### 4. Bereitung des P<sub>fr</sub>'-Chromopeptids

Die Präparation des P<sub>fr</sub>'-Chromopeptids ist im Detail bei Thümmeler und Rüdiger (Tetrahedron 39, 1943 (1983)) und Thümmeler et al. (Z. Naturforsch. 38c, 359 (1983)) beschrieben.

#### 5. Isolierung von C-Phycocyanin und PC-Chromopeptiden aus Spirulina maxima

3 g der sprühgetrockneten Blaualge (Fa. Dr. Behr, Düsseldorf) wurden in 15 ml Puffer (10 mM Tris-HCl/pH 7,4) aufgenommen

aufgenommen und 2 mal gefroren und aufgetaut (Zerstören der Zellwände). Anschließend wurde die Probe mit demselben Puffer auf 100 ml aufgefüllt und 30 min mit 45 000 x g ungelöste Zellpartikel abzentrifugiert. Zur Ausfällung chlorophyllhaltiger Substanzen wurde  $\text{CaCl}_2$  in einer Konzentration von 15 mM zugegeben und 10 min gerührt. Anschließend wurde der Extrakt 30 min mit 45 000 x g klarzentrifugiert und durch Verteilungschromatographie an Sephadex G-50 (Pharmacia) eine hohe Anreicherung des C-Phycocanins erzielt ( $A_{620}/A_{280} = 2$ ).

Säulengröße: 10 x 50 cm

Laufpuffer: Wasser

Phycocyanin eluiert im Ausschlußpeak und wurde zur Aufbewahrung gefriergetrocknet.

Die PC-Chromopeptide wurden durch Pepsinabbau des gefriergetrockneten Phycocyanin-Materials gewonnen und durch Adsorptionschromatographie an Biogel P-10 (Biorad) und anschließender präparativer isoelektrischer Fokussierung gereinigt und aufgetrennt. Im Detail ist dieses Verfahren bei Thümmel und Rüdiger (Tetrahedron 39, 1943 (1983)) beschrieben.

#### 6. Herstellung von E-konfiguriertem OEBV, DHOEBV und von E-konfigurierten Chromopeptiden aus Phytochrom ( $P_r$ ) und Phycocyanin

2 mg OEBV<sup>a</sup> wurden in 2 ml DMSO gelöst (vorher angelöst mit einem Tropfen Chloroform) und 2-Mercaptoethanol in einer Konzentration von 10% (v:v) zugegeben. Anschließend wurde die gelbe Probe im Eisbad unter Argon durch eine 5 cm dicke Wasser-

---

a) Herrn Prof. H. Scheer und Herrn Dr. W. Kufer danke ich herzlich für die Überlassung größerer Mengen an OEBV und DHOEBV

schicht mit einer 1000 W Photolampe belichtet (5 min). Dann wurde zu der belichteten Probe 2 ml Chloroform gegeben und die Chloroformphase zur Entfernung des 2-Mercaptoethanols ausgiebig mit Wasser gewaschen. Dieser Schritt mußte wegen der Lichtempfindlichkeit des E-konfigurierten Chromophors ebenso wie dessen Reinigung im grünen Sicherheitslicht durchgeführt werden. Dazu wurde die gewaschene Chloroformphase auf eine kleine Kieselge-60-Säule (Korngröße 0,063 - 0,2 mm, Merck; in Pasteurpipette) aufgetragen, die mit Chloroform äquilibriert war. Durch Spülen mit Chloroform konnte der Hauptteil des restlichen Mercaptoethanol und Z-konfiguriertes OEBV abgetrennt werden. Mit dem Lösungsmittelsystem Methanol : Chloroform = 1 : 100 konnte das E-konfigurierte OEBV in einer konzentrierten Fraktion eluiert werden. Die Endreinigung erfolgte dann durch präparative Schichtchromatographie an Kieselgel H (Merck, Darmstadt; selbstgestrichen auf 20 x 20 cm Glasplatten, Schichtdicke 0,5 mm; siehe Stahl, 1969).

Die Präparation von E-konfiguriertem DHOEBV<sup>a</sup> erfolgte nach dem gleichen Verfahren, nur daß anstatt 10, 25% (v:v) 2-Mercaptoethanol eingesetzt werden mußten.

Die Präparation E-konfigurierter Chromopeptide ist im Detail bei Thümmeler und Rüdiger (Tetrahedron 39, 1943 (1983)) beschrieben.

## 7. Denaturierung von Phytochrom

Die Denaturierungsversuche wurden im grünen Sicherheitslicht direkt in den Meßküvetten durchgeführt. In allen Versuchen wurde Affiblu-gereinigtes Phytochrom (120 KD) in 100 mM KPP/ pH 7,8 eingesetzt. Der OD<sub>660</sub> der Proben in der P<sub>r</sub>-Form betrug dabei rund 0,2.

---

a) siehe Fußnote Seite 146

#### Glycerin:

$P_r$  und  $P_{fr}$  wurden 1:1 (v:v) mit Glycerin versetzt und über Nacht gefriergetrocknet. Von diesen Proben wurden vor und nach Zugabe von Wasser oder von konz. Ameisensäure Absorptionsspektren aufgenommen.

#### Na-Dodecylsulfat (SDS):

$P_r$  und  $P_{fr}$  wurden mit einer 10proz. wässrigen SDS-Lösung (w:v) versetzt (Endkonzentration = 2%) und vor und nach Ansäuern mit konz. Ameisensäure (Endkonzentration = 5%, v:v) und anschließender Weißlichtbestrahlung (10 sec) Absorptionsspektren aufgenommen. SDS bildet mit Kaliumphosphatpuffer einen dichten weißen Niederschlag, der die Messungen aber nicht störte.

#### Harnstoff:

Für die CD-Messungen wurde  $P_r$  mit festem Harnstoff versetzt (Endkonzentration = 4,3 M). Absorptions- und CD-Spektren wurden aufgenommen: vor und nach Harnstoffzugabe, nach Belichtung (mehrmals mit monochromatischem Licht von 660 und 730 nm), nach Zugabe von konz. Ameisensäure (Endkonzentration = 5%, v:v) und anschließender Weißlichtbestrahlung (10 sec). Die CD- als auch die UV-Vis-Spektren wurden in einer zylindrischen Quarzküvette (Schichtdicke = 1 cm) aufgenommen.

#### 8-Anilinonaphtalin-1-Sulfonsäure Ammoniumsalz (ANS):

$P_r$  und  $P_{fr}$  wurden mit einer 140 mM ANS-Lösung (Merck, für biochemische Zwecke) versetzt (Endkonzentration = 10 mM). Vor und nach HR-Belichtung (30 sec bei 660 nm), nach Ansäuern mit konz. Ameisensäure (Endkonzentration = 5%, v:v) und anschließender Weißlichtbestrahlung (10 sec) wurden Absorptionsspektren aufgenommen.

### Tetranitromethan (TNM)

$P_r$  und  $P_{fr}$  wurden mit einer Lösung von 0,5 M TNM (Fluka) in Ethanol versetzt (Endkonzentration =  $3,6 \times 10^{-3}$  M; dies entsprach in etwa dem 1000 fachen molaren Überschuß von TNM über die Phytochromchromophore). Absorptionsspektren wurden vor und nach Zugabe von TNM, nach anschließender HR-Bestrahlung (30 sec bei 660 nm) und nach Zugabe von konz. Ameisensäure (Endkonzentration = 5%, v:v) aufgenommen.

Dieselbe Menge TNM wurde zu PC-Chromopeptid (F1 nach isoelektrischer Fokussierung; siehe Tab. 4) in 100 mM KPP/pH 7,8 ( $OD_{600} = 0,25$ ) zugegeben und vor und nach Zugabe Absorptionsspektren aufgenommen.

### 8. Berechnung der Absorptionsspektren von reinem $P_{fr}$ und Phytochromintermediaten

Als Phytochrommaterial wurde bei diesen Versuchen entweder 120 KD-Phytochrom (Brushite gereinigt) oder hoch angereichertes 60 KD-Phytochrom ( $A_{665}/A_{280} = 0,7$ ) eingesetzt.

$P_{fr}$  (60 KD) bei 20° C (Abb. 2c):

Es wurde aus dem Absorptionsspektrum von Phytochrom im Photogleichgewicht bei 660 nm (Abb. 2b) berechnet. Dazu wurden 20% von  $P_r$  (Abb. 2a) vom Spektrum der Abb. 2b abgezogen und das resultierende Spektrum durch 0,8 dividiert.

lumi-R (120 KD) bei -140° C (Abb. 25 A,d):

Es wurde unter der Annahme von 26% lumi-R im Spektrum der Abb. 25 A,b berechnet; dies bedeutet: 74%  $P_r$  (Abb. 25 A,a) wurden vom Spektrum der Abb. 25 A,b abgezogen und das resultierende Spektrum durch 0,26 dividiert.

meta-Ra (60 KD) bei -85° C (Abb. 25 B,d):

Es wurde unter der Annahme von 40% meta-Ra im Spektrum der Abb. 25 B,b berechnet; dies bedeutet: 60%  $P_r$  (Abb. 25 B,a)

wurden vom Spektrum der Abb. 25 B,b abgezogen und das resultierende Spektrum durch 0,4 dividiert.

meta-Rb (60 KF) bei  $-40^{\circ}$  C (Abb. 25 C,d):

Es wurde unter der Annahme von 15%  $P_{fr}$  im Spektrum der Abb. 25 C,c berechnet; dies bedeutet: 15%  $P_{fr}$  (berechnet aus dem Spektrum der Abb. 25 C,e unter der Annahme von 35%  $P_r$  (Abb. 25 C,a) im Spektrum der Abb. 25 C,e; siehe oben) wurde vom Spektrum der Abb. 25 C,b abgezogen und das resultierende Spektrum durch 0,85 dividiert.

meta-Fb (120 KD) bei  $-93^{\circ}$  C (Abb. 27 c):

Es wurde unter der Annahme von 23%  $P_{fr}$  im Spektrum der Abb. 27b berechnet; dies bedeutet: 23%  $P_{fr}$  (berechnet aus dem Spektrum der Abb. 27a unter der Annahme von 20%  $P_r$  (Abb. 27d) im Spektrum der Abb. 27a; siehe oben) wurde vom Spektrum der Abb. 27b abgezogen und das resultierende Spektrum durch 0,77 dividiert.

## 9. Aminosäureanalyse

Die Aminosäureanalysen wurden mit einem Analysator nach Hydrolyse der Peptide mit 6N HCl für 24 h ausgeführt. Für die Durchführung danke ich Herrn Prof. Dr. J. Otto vom Institut für Physiologische Chemie, München sehr herzlich.

V. Literaturverzeichnis

Anderson, G.R., Jenner, E.L. und Mumford, F.E.; Biochem. 8, 1182 (1969)

Balangé, A.P.; Physiol. Vég. 12, 95 (1974)

Blacha-Puller, M.; Dissertation Technische Universität Braunschweig (1979)

Borthwick, H.A., Hendricks, S.B. und Parker, M.W.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA 38, 929 (1952)

Borthwick, H.A.; in: Phytochrom (Mitrakos, K. und Shropshire, W.Jr.) S. 3f., Academic Press London-New York, 1972

Braiman, M. und Mathies, R.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 403 (1982)

Brandlmeier, T., Scheer, H. und Rüdiger, W.; Z. Naturforsch. 36c, 431 (1981a)

Brandlmeier, T., Lehner, H. und Rüdiger, W.; Photochem. Photobiol. 34, 69 (1981b)

Braslavsky, S.E., Holzwarth, A.R., Langer, E., Lehner, H., Matthews, J.J. und Schaffner, K.; Isr. J. Chem. 20, 196 (1980)

Braslavsky, S.E., Matthews, J.J., Herbert, H.J., de Kok, J., Spruit, C.J.P. und Schaffner, K.; Photochem. Photobiol. 31, 417 (1980a)

Braslavsky, S.E., Herbert, H.J., Holzwarth, A.R. und Schaffner, K.; J. of Chromat. 205, 85 (1981)

Braslavsky, S.E., Holzwarth, A.R. und Schaffner, K.; Angew. Chem. 95, 670 (1983)

Briggs, W.R. und Fork, C.D.; Plant. Physiol. 44, 1089 (1969)

- Brouillard, R.; *Phytochem.* 22, 1311 (1983)
- Burke, M.J., Pratt, D.C. und Moscovitz, A.; *Biochem.* 11, 4025 (1972)
- Butler, W.L., Norris, K.H., Siegelman, H.W. und Hendricks, S.B.; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 45, 1703 (1959)
- Butler, W.L., Hendricks, S.B. und Siegelman, H.W.; *Photochem. Photobiol.* 3, 521 (1964)
- Butler, W.L., Siegelman, H.W. und Mille, C.O.; *Biochem.* 3, 851 (1964a)
- Battersby, A.R., McDonagh, E. und O'Carra, P.; in: *Porphyrins and Metalloporphyrins* (Smith, K.M.) S. 61f., Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam-Oxford-New York, 1975
- Chae, Q. und Song, P.-S.; *J. of Amer. Chem. Soc.* 97, 4176 (1975)
- Colbert, J.T., Hershey, H.P. und Quail, P.H.; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80, 2248 (1983)
- Cordonnier, M.-M., Mathis, P. und Pratt, L.H.; *Photochem. Photobiol.* 34, 733 (1981)
- Crespi, H.L., Smith, U. und Katz, J.J.; *Biochem.* 7, 2232 (1968)
- Cross, D.R., Linschitz, H., Kasche, V. und Tennenbaum, J.; *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 61, 1095 (1969)
- Epel, B.L.; *Plante* 151, 1 (1981)
- Falk, H., Grubmayr, K., Herzig, U. und Hofer, O.; *Tetrahedron Lett.* 559 (1975)
- Falk, H. und Grubayr, K.; *Angew. Chem.* 89, 487 (1977)
- Falk, H. und Höllbacher, G.; *Mh. Chem.* 109, 1429 (1978)
- Falk, H. und Leodolter, A.; *Mh. Chem.* 109, 883 (1978)
- Falk, H., Grubmayr, K. und Schlederer, T.; *Mh. Chemie* 109, 1191 (1978a)

- Falk, H., Grubmayr, K., Haslinger, E., Schlederer, T. und Thirring, K.; Mh. Chem. 109, 1451 (1978b)
- Falk, H., Grubmayr, K. und Thirring, K.; Z. Naturforsch. 33b, 924 (1978c)
- Falk, H. und Grubmayr, K.; Mh. Chem. 110, 1237 (1979)
- Falk, H. und Thirring, K.; Z. Naturforsch. 35b, 376 (1980)
- Falk, H., Müller, N. und Schlederer, T.; Mh. Chem. 111, 159 (1980)
- Falk, H. und Thirring, K.; Tetrahedron 37, 761 (1981)
- Falk, H. und Müller, N.; Tetrahedron 39, 1875 (1983)
- Falk, H. und Zrunek, U.; Mh. Chem. 114, 1107 (1983)
- Fry, K.T. und Mumford, F.E.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 45, 1466 (1971)
- Furhop, J.-H., Wasser, P.K., Subramanian, J. und Schrader, U.; Liebigs Ann. Chem. 1974, 1450 (1974)
- Gossauer, A., Blacha, M. und Sheldrick, W.S.; J. Chem. Soc., Chem. Commun. 764 (1976)
- Gossauer, A., Blacha-Puller, M., Zeisberg, M. und Wray, V.; Liebigs Ann. Chem. 1981, 342 (1981)
- Gottmann, K.; Dissertation Universität Freiburg i. Br. (1981)
- Gottmann, K. und Schäfer, E.; Photochem. Photobiol., 35, 521 (1982)
- Gottmann, K. und Schäfer, E.; Planta 157, 392 (1983)
- Gressel, J.; Photochem. Photobiol. 30, 749 (1979)
- Grombein, S., Rüdiger, W. und Zimmermann, H.; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1709 (1975)
- Grombein, S.; Dissertation Universität München (1976)
- Hahn, T.-R., Kang, S.-S. und Song, P.-S.; Biochem. Biophys. Res. Commun. 97, 1317 (1980)

- Hahn, T.-R. und Song, P.-S.; Biochem. 20, 2602 (1981)
- Hartmann, K.M.; Photochem. Photobiol. 5, 349 (1966)
- Hartmann, K.M. und Haupt, W.; in: Biophysik S. 449f., Springer Berlin-Heidelberg-New York, 1978
- Holzwarth, A.R., Braslavsky, S.E., Culshaw, S. und Schaffner, K.; Photochem. Photobiol. 36, 581 (1982)
- Honig, B., Ebrey, T., Callender, R.H., Dinur, U. und Ottolenghi, M.; Proc. Nat. Acad. Sci USA 76, 2503 (1979)
- Hunt, R.E. und Pratt, L.H.; Plant Physiol. 64, 327 (1979)
- Hunt, R.E. und Pratt, L.H.; Biochem. 20, 941 (1981)
- Inoue, Y., Konomik, K. und Furuya, M., Plant Cell Physiol. 23, 731 (1982)
- Kendrick, R.E. und Spruit, S.J.P.; Photochem. Photobiol. 26, 201 (1977)
- Kersch, L. und Nowitzki, S.; FEBS Lett. 146, 173 (1982)
- Klein, G., Grombein, S. und Rüdiger, W.; Hoppe-Seyler's Physiol. Chem. 358, 1077 (1977)
- Köst, H.-P., Rüdiger, W. und Chapman, D.J.; Liebigs Ann. Chem. 1975, 1582 (1975)
- Köst, H.-P. und Benedikt, E.; Z. Naturforsch. 37c, 1057 (1982)
- Krauss, C. und Scheer, H.; Tetrahedron Lett. 37, 3553 (1979)
- Krauss, C.; Dissertation Universität München (1980)
- Krauss, C. und Scheer, H.; Photochem. Photobiol. 34, 385 (1981)
- Kufer, W. und Scheer, H.; Z. Naturforsch. 37c, 179 (1982)
- Lagarias, J.C., Alexander, N.G. und Rapoport, H.; J. Am. Chem. Soc. 101, 5030 (1979)
- Lagarias, J.C. und Rapoport, H.; J. Am. Chem. Soc. 102, 4821 (1980)

- Lehner, H., Braslavsky, S.E. und Schaffner, K.; Angew. Chem. 90, 1012 (1978a)
- Lehner, H., Braslavsky, S.E. und Schaffner, K.; Liebigs Ann. Chem. 1978, 1990 (1978b)
- Lehner, H., Riemer, W. und Schaffner, K.; Liebigs Ann. Chem. 1979, 1798 (1979)
- Lehner, H. Krauss, C. und Scheer, H.; Z. Naturforsch. 36b, 735 (1981)
- Lehner, H. und Scheer, H.; Z. Naturforsch. 38c, 353 (1983)
- Linschitz, H., Kasche, V., Butler, W.L. und Siegelman, H.W.; J. Bio. Chem. 241, 3395 (1966)
- Mancinelli, A.L. und Rabino, J.; Bot. Rev. 44, 129 (1978)
- Marmé, D.; Ann. Rev. Plant Physiol. 28, 173 (1977)
- Mc Donagh, A.F. in: The Porphyrins (Dolphin, D.) Vo. VI, S. 293f., Academic Press, New York 1979
- Mohr, H., Photochem. Photobiol. 5, 469 (1966)
- Mohr, H. und Schopfer, P.; Lehrbuch der Pflanzenphysiologie, 3. Auflage, S. 311f., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1978
- Moscowitz, A., Krüger, W.C., Kay, I.T., Skews, G. und Bruckstein, S.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA 52, 1190 (1964)
- Neubacher, H. und Lohmann, W. in Biophysik, S. 95f., Springer, Berlin-Heidelber-New York, 1978
- O'Carra, P. und O'hEocha, C. in: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments (Goodwin, T.W.) 2. Ausgabe, Vol. 1, S. 328f., Academic Press, London, 1976
- Offner, G.D., Brown-Mason, A.S., Ehrahrd, M.M. und Troxler, R.F.; J. Bio. Chem. 256, 12167 (1981)

- Ottolenghi, M.; Adv. Photochem. 12, 97 (1980)
- Parker, M.W., Hendricks, S.B. und Borthwick, H.A.; Bot. Gaz. 111, 242 (1950)
- Pasternak, R. und Wagnière, G.J.; J. Amer. Chem. Soc. 101, 1662 (1979)
- Pratt, L.H. und Butler, W.L.; Photochem. Photobiol. 8, 477 (1968)
- Pratt, L.H. und Bulter, W.L.; Photochem. Photobiol. 11, 503 (1970)
- Pratt, L.H.; Photochem. Photobiol. 22, 33 (1975)
- Pratt, L.H.; Photochem. Photobiol. 27, 81 (1978)
- Pratt, L.H.; Photochem. Photobiol. Rev. 4, 59 (1979)
- Pratt, L.H.; Ann. Rev. Plant Physiol. 33, 557 (1982)
- Pratt, L.H., Shimazaki, Y., Inoue, J. und Furuya, M.; Photochem. Photobiol. 36, 471 (1982)
- Rabier, J., Vijayalakshme, M. und Rüdiger, W.; Z. Naturforsch. 38c, 230 (1983)
- Rice, H.V. und Briggs, W.R.; Plant Physiol. 51, 927 (1973)
- Rice, H.V., Briggs, W.R. und Jackson-White, C.J.; Plant Physiol. 51, 917 (1973)
- Roux, S.J., McEntire, K. und Brown, W.E.; Photochem. Photobiol. 35, 537 (1982)
- Rüdiger, W. und Correll, D.L.; Liebigs Ann. Chem. 723, 208 (1969)
- Rüdiger, W.; Fortschr. Chem. Org. Natust. 29, 59 (1971)
- Rüdiger, W.; Struct. Bonding 40, 101 (1980)
- Rüdiger, W., Brandlmeier, T. Blos, I., Gossauer, A. und Weller, J.-P.; Z. Naturforsch. 35c, 763 (1980)
- Sarker, H.K. und Song, P.S.; Biochem. 20, 4315 (1981)

- Scheer, H.; Z. Naturforsch. 31c, 413 (1976)
- Scheer, H. und Kufer, W.; Z. Naturforsch. 32c, 513 (1977)
- Scheer, H., Linsenmeier, U. und Krauss, C.; Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 185 (1977)
- Scheer, H., Angew. Chem. 93, 230 (1981)
- Scheer, H., Formanek, H. und Schneider, S.; Photochem. Photobiol. 36, 259 (1982)
- Schopfer, P.; Ann. Rev. Plant Physiol. 28, 223 (1977)
- Sheldrick, W.S.; J. Chem. Soc. Perkin Trans. II 1456 (1976)
- Shimazaki, Y., Inoue, J., Yamamoto, K.T. und Furuya, M.; Plant Cell Physiol., 21, 1619 (1980)
- Siegelman, H.W. und Firer, E.M.; Biochem. 3, 418 (1964)
- Siegelman, H.W. und Hendricks, S.W.; Feder. Proc. 24, 863 (1965)
- Siegelman, H.W., Turner, W.C. und Hendricks, S.B.; Plant Physiol 41, 1289 (1966)
- Smith, H.; Phytochrome and Photomorphogenesis, McGraw-Hill, London, 1975
- Smith, H. und Kendrick, R.E.; in: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments (Goodwin, T.W.) 2. Auflage, Vol. 1, S. 377f. Academic Press, London 1976
- Smith, W.O.Jr. und Daniels, S.M.; Plant Physiol. 68, 443 (1981)
- Smith, W.O.Jr.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA 78, 2977 (1981)
- Song, P.-S., Chae, Q. und Gardner, J.D.; Biochim. Biophys. Acta 576, 479 (1979)
- Song, P.-S., Sarkar, H.K., Kim, I.-S. und Poff, K.L.; Biochim. Biophys. Acta 635, 369 (1981)

- Song, P.-S., Sarkar, H.K. Tabba, H. und Smith, K.M.; Biochim. Biophys. Res. Commun. 105, 279 (1982)
- Spruit, C.J.P. und Kendrick, R.E.; Photochem. Photobiol. 18, 145 (1973)
- Spruit, C.J.P., Kendrick, R.E. und Cooke, R.J.; Planta 127, 121 (1975)
- Spruit, C.J.P. und Kendrick, R.E.; Photochem. Photobiol. 26, 133 (1977)
- Stahl, E.; Dünnschichtchromatographie, 2. Auflage, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1969
- Sugimoto, T., Ishikawa, K. und Suzuki, H.; J. Phys. Soc. Japan 40, 258 (1976)
- Sugimoto, T., Oishi, M. und Suzuki, H.; J. Phys. Soc. Japan 43, 619 (1977)
- Suzuki, H., Sugimoto, T. und Ishikawa, K.; J. Phys. Soc. Japan 38, 1110 (1975)
- Thümmel, F., Brandlmeier, T. und Rüdiger, W.; Z. Naturforsch. 36c, 440 (1981)
- Tobin, E.M. und Briggs, W.R.; Photochem. Photobiol. 18, 487 (1973)
- Tobin, E.M., Briggs, W.R. und Brown, P.K.; Photochem. Photobiol. 18, 497 (1973)
- Tokutomi, S., Yamamoto, K.T., Miyoshi, Y. und Furuya, M.; Photochem. Photobiol. 35, 431 (1982)
- Verbelen, J.-P., Pratt, L.H., Butler, W.L. und Tokuyasu, K.; Plant Physiol. 70, 4 (1982)
- Vierstra, R.D. und Quail, P.H.; Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79, 5272 (1982a)
- Vierstra, R.D. und Quail, P.H.; Planta 156, 158 (1982b)
- Vierstra, R.D. und Quail, P.H.; Biochem. 22, 2498 (1983a)

Wagnière, G. und Blauer, G.; J. Am. Chem. Soc. 98, 7806  
(1976)

Whitelam, G.C.; Nature 305, 184 (1983)

Yamamoto, K.T. und Smith, W.O.Jr.; Plant and Cell Physiol.  
22, 1149 (1981)

Yamamoto, K.T. und Furuya, M.; Plant and Cell Physiol. 24,  
713 (1983)

Yoshizawa, T. and Wald, G.; Nature 197, 1279 (1963)



## Lebenslauf

|           |                                                                                                       |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 19.4.1953 | Geburt in Rosenheim                                                                                   |
| 1959-1964 | Volksschule in Puchheim                                                                               |
| 1964-1974 | Graf Rasso Gymnasium in Fürstenfeldbruck                                                              |
| 1974      | Abitur                                                                                                |
| 1974-1975 | Bundeswehr                                                                                            |
| 1975      | Beginn des Biologiestudiums an der Universität München                                                |
| 1977      | Diplom-Biologen-Vorprüfung                                                                            |
| 1980      | Diplom-Biologen-Hauptprüfung                                                                          |
| 1980-1981 | Diplomarbeit am Lehrstuhl für Phytochemie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger            |
| 1981      | Beginn der Dissertation am Lehrstuhl für Phytochemie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Rüdiger |









